



(11) **EP 1 694 829 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention de la délivrance du brevet:
04.08.2010 Bulletin 2010/31

(21) Numéro de dépôt: **04805625.3**

(22) Date de dépôt: **02.12.2004**

(51) Int Cl.:
C12N 7/00 (2006.01)

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2004/003106

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2005/056584 (23.06.2005 Gazette 2005/25)

(54) **NOUVELLE SOUCHE DE CORONAVIRUS ASSOCIE AU SRAS ET SES APPLICATIONS.**
NEUER MIT SARS VERBUNDEN CORONAVIRUS STAMM UND SEINE VERWENDUNGEN
NOVEL STRAIN OF SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS AND APPLICATIONS THEREOF

(84) Etats contractants désignés:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR

(30) Priorité: **02.12.2003 FR 0314151**
02.12.2003 FR 0314152

(43) Date de publication de la demande:
30.08.2006 Bulletin 2006/35

(60) Demande divisionnaire:
10005885.8

(73) Titulaires:
• **INSTITUT PASTEUR**
75724 Paris Cedex 15 (FR)
• **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**
75794 Paris Cedex 16 (FR)
• **UNIVERSITE PARIS VII**
75251 Paris Cedex 05 (FR)

(72) Inventeurs:
• **VAN DER WERF, Sylvie**
F-91190 Gif-sur-yvette (FR)
• **ESCRIOU, Nicolas**
F-75014 Paris (FR)
• **CRESCENZO-CHAIGNE, Bernadette**
F-92200 Neuilly-sur-seine (FR)
• **MANUGUERRA, Jean-Claude**
F-75018 Paris (FR)
• **KUNST, Frederik,**
Inst. Pasteur
Bureau des Brevets et Inventions
75724 Paris Cedex 15 (FR)
• **CALLENDRET, Benoît**
F- 92000 Nanterre (FR)

- **BETTON, Jean-Michel**
75014 Paris (FR)
- **LORIN, Valérie**
92120 Montrouge (FR)
- **GERBAUD, Sylvie**
94100 Saint Maur Des Fosses (FR)
- **BURGUIERE, Ana Maria**
92140 Clamart (FR)
- **AZEBI, Saliha**
94400 Vitry-sur-seine (FR)
- **CHARNEAU, Pierre**
75005 Paris (FR)
- **TANGY, Frédéric**
93260 Les Lilas (FR)
- **COMBREDET, Chantal**
75017 Paris (FR)
- **DELAGNEAU, Jean-François**
78170 La Celle Saint Cloud (FR)
- **MARTIN, Monique**
92290 Chatenay Malabry (FR)

(74) Mandataire: **Marcadé, Véronique et al**
Cabinet Ores
36, rue de St Pétersbourg
75008 Paris (FR)

(56) Documents cités:
• **DATABASE EMBL 22 avril 2003 (2003-04-22), XP002294758 Database accession no. AY278489**
• **DATABASE EMBL 10 juin 2003 (2003-06-10), XP002294760 Database accession no. AY290752**
• **DATABASE UNIPROT 10 octobre 2003 (2003-10-10), XP002294761 Database accession no. P59595**

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 1 694 829 B1

- **MARRA M A ET AL: "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 300, no. 5624, 30 mai 2003 (2003-05-30), pages 1399-1404, XP002269483 ISSN: 0036-8075**
- **CHE X-Y ET AL: "RAPID AND EFFICIENT PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN BY IMMUNIZING MICE" DI YI JUNYI DAXUE XUEBAO - ACADEMIC JOURNAL OF FIRST MEDICAL COLLEGE OF PLA, GAI KAN BIANJISHI, GUANGZHOU, CN, vol. 23, no. 7, juillet 2003 (2003-07), pages 640-642, XP008028243 ISSN: 1000-2588**
- **WANG J ET AL: "ASSESSMENT OF IMMUNOREACTIVE SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE STRUCTURAL PROTEINS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 12, 13 novembre 2003 (2003-11-13), pages 1989-1996, XP001182489 ISSN: 0009-9147**
- **SHI Y ET AL: "DIAGNOSIS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME (SARS) BY DETECTION OF SARS CORONAVIRUS NUCLEOCAPSID ANTIBODIES IN AN ANTIGEN-CAPTURING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 41, no. 12, décembre 2003 (2003-12), pages 5781-5782, XP008028263 ISSN: 0095-1137**
- **LIU G ET AL: "The C-Terminal Portion of the Nucleocapsid Protein Demonstrates SARS-CoV Antigenicity" GENOMICS, PROTEOMICS AND BIOINFORMATICS, vol. 1, no. 3, 2003, pages 193-197, XP001183377**
- **POON LEO L M ET AL: "Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS)" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 6 Pt 1, juin 2003 (2003-06), pages 953-955, XP002288942 ISSN: 0009-9147**

Description

[0001] La présente invention est relative à une nouvelle souche de coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), issue d'un prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevé à Hanoi (Vietnam), à des molécules d'acide nucléique issues de son génome, aux protéines et peptides codés par lesdites molécules d'acide nucléique ainsi qu'à leurs applications, notamment en tant que réactifs de diagnostic et/ou comme vaccin.

[0002] Le coronavirus est un virus à ARN monocaténaire, de polarité positive, d'approximativement 30 kilobases qui se réplique dans le cytoplasme des cellules hôtes ; l'extrémité 5' du génome a une structure en coiffe et l'extrémité 3' comporte une queue polyA. Ce virus est enveloppé et comprend, à sa surface, des structures péplomériques dénommées spicules.

[0003] Le génome comprend les cadres ouverts de lecture ou ORF suivants, de son extrémité 5' vers son extrémité 3' : ORF1a et ORF1b correspondant aux protéines du complexe de transcription-réplication, et ORF-S, ORF-E, ORF-M et ORF-N correspondant aux protéines structurales S, E, M et N. Il comprend également des ORFs correspondant à des protéines de fonction inconnue codées par : la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant cette dernière, la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N, et la région incluse dans l'ORF-N.

[0004] La protéine S est une glycoprotéine membranaire (200-220 kDa) qui se présente sous la forme de spicules ou "Spike" émergeant de la surface de l'enveloppe virale. Elle est responsable de l'attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte et de l'induction de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

[0005] La petite protéine d'enveloppe (E) également dénommée sM (*small membrane*) qui est une protéine transmembranaire non glycosylée d'environ 10 kDa, est la protéine présente en plus faible quantité dans le virion. Elle joue un rôle moteur dans le processus de bourgeonnement des coronavirus qui se produit au niveau du compartiment intermédiaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

[0006] La protéine M ou protéine de matrice (25-30 kDa) est une glycoprotéine membranaire plus abondante qui est intégrée dans la particule virale par une interaction M/E, tandis que l'incorporation de S dans les particules est dirigée par une interaction S/M. Elle semble être importante pour la maturation virale des coronavirus et pour la détermination du site au niveau duquel les particules virales sont assemblées.

[0007] La protéine N ou protéine de nucléocapside (45-50 kDa) qui est la plus conservée parmi les protéines structurales des coronavirus, est nécessaire pour encapsider l'ARN génomique puis pour diriger son incorporation dans le virion. Cette protéine est vraisemblablement également impliquée dans la réplication de l'ARN.

[0008] Lorsqu'une cellule hôte est infectée, le cadre de lecture (ORF) situé en 5' du génome viral est traduit en une polyprotéine qui est clivée par les protéases virales et libère alors plusieurs protéines non-structurales telles que l'ARN-polymérase ARN dépendante (Rep) et l'ATPase hélicase (Hel). Ces deux protéines sont impliquées dans la réplication du génome viral ainsi que dans la génération de transcrits qui sont utilisés dans la synthèse des protéines virales. Les mécanismes par lesquels ces ARNms sub-génomiques sont produits, ne sont pas complètement compris ; cependant des faits récents indiquent que les séquences de régulation de la transcription à l'extrémité 5' de chaque gène représentent des signaux qui régulent la transcription discontinuée des ARNms sub-génomiques.

[0009] Les protéines de la membrane virale (protéines S, E et M) sont insérées dans le compartiment intermédiaire, alors que l'ARN répliqué (brin +) s'assemble avec la protéine N (nucléocapside). Ce complexe protéine-ARN s'associe ensuite avec la protéine M incluse dans les membranes du réticulum endoplasmique et les particules virales se forment lorsque le complexe de la nucléocapside bourgeonne dans le réticulum endoplasmique. Le virus migre ensuite à travers le complexe du Golgi et éventuellement sort de la cellule, par exemple par exocytose. Le site de l'attachement du virus à la cellule hôte se trouve au niveau de la protéine S.

[0010] Les coronavirus sont responsables de 15 à 30 % des rhumes chez l'Homme et d'infections respiratoires ou digestives chez les animaux, notamment le chat (FIPV : *Feline infectious peritonitis virus*), la volaille (IBV : *Avian Infectious bronchitis virus*), la souris (MHV : *Mouse Hepatitis virus*), le porc (TGEV : *Transmissible gastroenteritis virus*, PEDV : *Porcine Epidemic Diarrhea virus*, PRCoV : *Porcine Respiratory Coronavirus*, HEV : *Hemagglutinating encephalomyelitis Virus*) et les bovins (BcoV : *Bovine coronavirus*).

[0011] En général, chaque coronavirus n'affecte qu'une seule espèce ; chez les individus immunocompétents, l'infection induit des anticorps éventuellement neutralisants et une immunité cellulaire, capables de détruire les cellules infectées.

[0012] Une épidémie de pneumonie atypique, dénommée syndrome respiratoire aigu sévère (SARS ou *Severe acute respiratory syndrome*, SRAS en français) s'est propagée dans différents pays (Vietnam, Hong-Kong, Singapour, Thaïlande et Canada) au cours du premier trimestre 2003, à partir d'un foyer initial apparu en Chine dans le dernier trimestre de 2002. La sévérité de cette maladie est telle que son taux de mortalité est d'environ 3 à 6 %. La détermination de l'agent causatif de cette maladie a été entreprise par de nombreux laboratoires, à travers le monde.

[0013] En mars 2003, un nouveau coronavirus (SARS-CoV, SARS virus ou virus SRAS, en français) a été isolé, en association avec des cas de syndrome respiratoire aigu sévère (T.G.KSIAZEK et al., *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348, 1319-1330 ; C. DROSTEN et al., *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348, 1967-1976 ;

Peiris et al., Lancet, 2003, 361, 1319-).

[0014] Des séquences génomiques de ce nouveau coronavirus ont ainsi été obtenues, notamment celles de l'isolat Urbani (Genbank n° d'accès AY274119.3 et A. MARRA et al., Science, May 1, 2003, 300, 1399-1404) et de l'isolat de Toronto (Tor2, Genbank n° d'accès AY 278741 et A. ROTA et al., Science, 2003, 300, 1394-1399).

[0015] L'organisation du génome est comparable à celle des autres coronavirus connus permettant ainsi de confirmer l'appartenance du SARS-CoV à la famille des *Coronaviridae* ; les cadres ouverts de lecture ORF1a et 1b et les cadres ouverts de lecture correspondant aux protéines S, E, M, et N, ainsi qu'à des protéines codées par : la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E (ORF3), la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E (ORF4), la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N (ORF7 à ORF11) et la région correspondant à l'ORF-N (ORF13 et ORF14), ont notamment été identifiées.

[0016] Sept différences ont été mises en évidence entre les séquences des isolats Tor2 et Urbani ; 3 correspondent à des mutations silencieuses (c/t en position 16622 et a/g en position 19064 de l'ORF1b, t/c en position 24872 de l'ORF-S) et 4 modifient la séquence en acides aminés de respectivement : les protéines codées par l'ORF1a (c/t en position 7919 correspondant à la mutation A/V), la protéine S (g/t en position 23220 correspondant à la mutation A/S), la protéine codée par l'ORF3 (a/g en position 25298 correspondant à la mutation R/G) et de la protéine M (t/c en position 26857 correspondant à la mutation S/P).

[0017] En outre, l'analyse phylogénétique montre que le SARS-CoV est éloigné des autres coronavirus et qu'il est apparu, ni par mutation de coronavirus respiratoires humains, ni par recombinaison entre des coronavirus connus (pour une revue, voir Holmes, J.C.I., 2003, 111, 1605-1609).

[0018] La mise en évidence et la prise en compte de nouveaux variants sont importantes pour la mise au point de réactifs de détection et de diagnostic du SRAS suffisamment sensibles et spécifiques ainsi qu'à des compositions immunogènes aptes à protéger des populations contre des épidémies de SRAS.

[0019] Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence une autre souche de coronavirus associé au SRAS, qui se distingue des isolats Tor2 et Urbani.

[0020] La présente invention a donc pour objet, une souche isolée ou purifiée de coronavirus humain associé au syndrome respiratoire aigu sévère, caractérisée en ce que son génome présente sous la forme d'ADN complémentaire un codon sérine en position 23220-23222 du gène de la protéine S ou un codon glycine en position 25298-25300 du gène de l'ORF3, et un codon alanine en position 7918-7920 de l'ORF1a ou un codon sérine en position 26857-26859 du gène de la protéine M, lesdites positions étant indiquées en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

[0021] Selon un mode de réalisation avantageux de ladite souche, l'équivalent ADN de son génome présente une séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 1 ; cette souche de coronavirus est issue du prélèvement de lavage bronchoalvéolaire d'un patient atteint de SRAS, répertorié sous le n° 031589 et effectué à l'hôpital français de Hanoi (Vietnam).

[0022] Conformément à l'invention, ladite séquence SEQ ID NO :1 est celle de l'acide désoxyribonucléique correspondant à la molécule d'acide ribonucléique du génome de la souche isolée de coronavirus telle que définie ci-dessus.

[0023] La séquence SEQ ID NO : 1 se distingue de la séquence Genbank AY274119.3 (isolat Tor2) en ce qu'elle possède les mutations suivantes :

- g/t en position 23220 ; le codon alanine (gct) en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de Tor2 est remplacé par un codon sérine (tct),
- a/g en position 25298 ; le codon arginine (aga) en position 11 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF3 de Tor 2 est remplacé par un codon glycine (gga).

[0024] En outre, la séquence SEQ ID NO : 1 se distingue de la séquence Genbank AY278741 (isolat Urbani) en ce qu'elle possède les mutations suivantes :

- t/c en position 7919 ; le codon valine (ggt) en position 2552 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF1a est remplacé par un codon alanine (gct),
- t/c en position 16622 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés des protéines codées par l'ORF1b (mutation silencieuse),
- g/a en position 19064 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés des protéines codées par l'ORF1b (mutation silencieuse),
- c/t en position 24872 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés de la protéine S, et
- c/t en position 26857 : le codon proline (ccc) en position 154 de la séquence en acides aminés de la protéine M est remplacé par un codon sérine (tcc).

[0025] En l'absence de mention particulière, les positions des séquences nucléotidiques et peptidiques sont indiquées en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

[0026] La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé ou purifié, caractérisé en ce que sa séquence est celle du génome de la souche isolée de coronavirus telle que définie ci-dessus.

[0027] Selon un mode de réalisation avantageux dudit polynucléotide il présente la séquence SEQ ID NO : 1.

[0028] Les Inventeurs décrivent également un polynucléotide isolé ou purifié, caractérisé en ce que sa séquence hybride dans des conditions de forte stringence avec la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus.

[0029] Les termes « isolé ou purifié » signifient modifié « par la main de l'homme » à partir de l'état naturel ; autrement dit si un objet existe dans la nature, il est dit isolé ou purifié s'il a été modifié ou extrait de son environnement naturel ou les deux. Par exemple, un polynucléotide ou une protéine/un peptide naturellement présent dans un organisme vivant n'est ni isolé, ni purifié ; en revanche le même polynucléotide ou protéine /peptide séparé des molécules coexistantes dans son environnement naturel, obtenu par clonage, amplification et/ou synthèse chimique est isolé au sens de la présente invention. De plus, un polynucléotide ou une protéine/peptide qui est introduit dans un organisme par transformation, manipulation génétique ou par toute autre méthode, est « isolé » même s'il est présent dans ledit organisme. Le terme purifié tel qu'utilisé dans la présente invention, signifie que les protéines /peptides selon l'invention sont essentiellement libres d'association avec les autres protéines ou polypeptides, comme l'est par exemple le produit purifié de la culture de cellules hôtes recombinantes ou le produit purifié à partir d'une source non-recombinante.

[0030] On entend par conditions d'hybridation de forte stringence, des conditions de température et de force ionique choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation spécifique et sélective entre polynucléotides complémentaires.

[0031] A titre d'illustration, des conditions de forte stringence aux fins de définir les polynucléotides ci-dessus, sont avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation pendant 20 heures à 42°C suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C.

[0032] Les Inventeurs décrivent également un fragment représentatif du polynucléotide tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu, soit par l'utilisation d'enzymes de restriction dont les sites de reconnaissance et de coupure sont présents dans ledit polynucléotide tel que défini ci-dessus, soit par amplification à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques dudit polynucléotide tel que défini ci-dessus, soit par transcription *in vitro*, soit par synthèse chimique.

[0033] Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment, il est sélectionné dans le groupe constitué par : l'ADNc correspondant à au moins un cadre ouvert de lecture (ORF) choisi parmi : ORF1a, ORF1b, ORF-S, ORF-E, ORF-M, ORF-N, ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11, ORF 13 et ORF 14, et l'ADNc correspondant aux extrémités 5' ou 3' non-codantes dudit polynucléotide.

[0034] Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit fragment présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences SEQ ID NO : 2 et 4 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-S qui code pour la protéine S,
- les séquences SEQ ID NO : 13 et 15 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-E qui code pour la protéine E,
- les séquences séquence SEQ ID NO: 16 et 18 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-M qui code pour la protéine M,
- les séquences SEQ ID NO : 36 et 38 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-N qui code pour la protéine N,
- les séquences représentant les ADNc correspondant respectivement : aux ORF1a et ORF1b (ORF1ab, SEQ ID NO : 31), aux ORF3 et ORF4 (SEQ ID NO : 7, 8), aux ORF 7 à 11 (SEQ ID NO : 19, 20), à l'ORF13 (SEQ ID NO : 32) et à l'ORF 14 (SEQ ID NO : 34), et
- les séquences représentant les ADNc correspondant respectivement aux extrémités 5'(SEQ ID NO : 39 et 72) et 3' non-codantes (SEQ ID NO : 40, 73) dudit polynucléotide.

[0035] Les Inventeurs décrivent également un fragment de l'ADNc codant pour la protéine S, tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 5 et 6 (fragments Sa et Sb).

[0036] Les Inventeurs décrivent également un fragment de l'ADNc correspondant aux ORF1a et ORF1b tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 41 à 54 (fragments L0 à L12).

[0037] Les Inventeurs décrivent également un fragment du polynucléotide tel que défini ci dessus, caractérisé en ce qu'il présente au moins 15 bases ou paires de bases consécutives de la séquence du génome de ladite souche incluant au moins une de celles situées en position 7979, 16622, 19064, 23220, 24872, 25298 et 26857. De préférence, il s'agit d'un fragment de 20 à 2500 bases ou paires de bases, de manière préférée de 20 à 400.

EP 1 694 829 B1

[0038] La présente invention a également pour objet un fragment du polynucléotide tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les ou est constitué des bases ou de paires de bases consécutives des positions 7919 à 23220, 7919 à 25298, 16622 à 23220, 19064 à 23220, 16622 à 25298, 19064 à 25298, 23220 à 24872, 23220 à 26857, 24872 à 25298, ou 25298 à 26857.

[0039] Les Inventeurs décrivent également des amorces d'au moins 18 bases aptes à amplifier un fragment du génome d'un coronavirus associé au SRAS ou de l'équivalent ADN de celui-ci.

[0040] Selon un mode de réalisation desdites amorces, elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par :

- la paire d'amorces n° 1 correspondant respectivement aux positions 28507 à 28522 (amorce sens, SEQ ID NO : 60) et 28774 à 28759 (amorce anti-sens, SEQ ID NO : 61) de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus,
- la paire d'amorces n° 2 correspondant respectivement aux positions 28375 à 28390 (amorce sens, SEQ ID NO : 62) et 28702 à 28687 (amorce anti-sens, SEQ ID NO : 63) de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus.,
et
- la paire d'amorces constituée des amorces SEQ ID Nos 55 et 56.

[0041] Les Inventeurs décrivent également une sonde apte à détecter la présence du génome d'un coronavirus associé au SRAS ou d'un fragment de celui-ci, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par : les fragments tels que définis ci-dessus et les fragments correspondant aux positions suivantes de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus : 28561 à 28586, 28588 à 28608, 28541 à 28563 et 28565 à 28589 (SEQ ID NO : 64 à 67).

[0042] Les sondes et amorces telles que définies ci-dessus peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'Homme du Métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ³²P, le ³³P, le ³⁵S, le ³H ou l'¹²⁵I. Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

[0043] Les Inventeurs décrivent des sondes et des amorces marquées dérivées des séquences précédentes.

[0044] De telles sondes et amorces sont utiles pour le diagnostic de l'infection par un coronavirus associé au SRAS.

[0045] Les Inventeurs décrivent également une méthode de détection d'un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, laquelle méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

- (a) l'extraction d'acides nucléiques présents dans ledit échantillon biologique,
- (b) l'amplification d'un fragment de l'ORF-N par RT-PCR à l'aide d'une paire d'amorces telle que définie ci-dessus, et
- (c) la détection par tout moyen approprié des produits d'amplifications obtenus en (b).

[0046] Les produits d'amplifications (amplicons) en (b) sont de 268 pb pour la paire d'amorces n° 1 et de 328 pb pour la paire d'amorces n°2.

[0047] Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, l'étape (c) de détection est réalisée à l'aide d'au moins une sonde correspondant aux positions 28561 à 28586, 28588 à 28608, 28541 à 28563 et 28565 à 28589 de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus.

[0048] De préférence, le génome du coronavirus associé au SRAS est détecté et éventuellement quantifié par PCR en temps réel, à l'aide de la paire d'amorces n°2 et des sondes correspondant aux positions 28541 à 28563 et 28565 à 28589 marquées avec des composés différents, notamment des agents fluorescents différents.

[0049] La RT-PCR en temps réel qui met en oeuvre cette paire d'amorces et cette sonde est très sensible puisqu'elle permet de détecter 10² copies d'ARN et jusqu'à 10 copies d'ARN, elle est en outre fiable et reproductible.

[0050] Les Inventeurs décrivent des polydésoxyribonucléotides et des poly-ribonucléotides simple-brin, double-brin et tripe-brin correspondant à la séquence du génome de la souche isolée de coronavirus et de ses fragments tels que définis ci-dessus, ainsi qu'à leurs séquences complémentaires, sens ou anti-sens, notamment les ARN et les ADNc correspondant à la séquence du génome et de ses fragments tels que définis ci-dessus.

[0051] Les Inventeurs décrivent également des fragments d'amplification obtenus à l'aide d'amorces spécifiques du génome de la souche purifiée ou isolée tel que défini ci-dessus, notamment à l'aide d'amorces et de paires d'amorces telles que définies ci-dessus, des fragments de restriction constitués par ou comprenant la séquence des fragments tels que définis ci-dessus, des fragments obtenus par transcription *in vitro* à partir d'un vecteur contenant la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment tel que défini ci-dessus, ainsi que des fragments obtenus par synthèse chimique. Des exemples de fragments de restriction sont déduits de la carte de restriction de la séquence SEQ ID NO : 1 illustrée par la figure 13. Lesdits fragments sont, soit sous forme de fragments isolés, soit sous forme de mélanges de fragments. Les Inventeurs décrivent également des fragments modifiés, par rapport aux précédents, par enlèvement, ou addition de nucléotides dans une proportion d'environ 15 %, par rapport à la longueur des fragments ci-dessus et/ou modifiés au niveau de la nature des nucléotides, dès lors que les fragments nucléotidiques modifiés conservent une capacité

d'hybridation avec les séquences d'ARN génomiques ou antigénomiques de l'isolat tel que défini ci-dessus.

[0052] Les molécules d'acide nucléique telles que définies ci-dessus sont obtenues par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, elles peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

[0053] Les Inventeurs décrivent également une puce ou filtre à ADN ou à ARN, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polynucléotide ou l'un de ses fragments tels que définis ci-dessus.

[0054] Les puces ou filtres à ADN ou à ARN tels que définis ci-dessus sont préparés par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, comme par exemple greffage chimique ou électrochimique d'oligonucléotides sur support de verre ou de nylon.

[0055] Les Inventeurs décrivent également un vecteur de clonage et/ou d'expression recombinant, notamment un plasmide, un virus, un vecteur viral ou un phage comprenant un fragment d'acide nucléique tel que défini ci-dessus. De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ledit fragment d'acide nucléique est placé sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. En outre, ledit vecteur peut comprendre des séquences (étiquettes ou tag) fusionnées en phase avec l'extrémité 5' et/ou 3' dudit insert, utiles pour l'immobilisation, et/ou la détection et/ou la purification de la protéine exprimée à partir dudit vecteur.

[0056] Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes. De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

[0057] Ledit plasmide est notamment sélectionné parmi les plasmides suivants :

- le plasmide, dénommé SARS-S, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3059, le 20 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 25348 (SEQ ID NO : 4), en référence à la séquence Genbank AY274119.3,
- le plasmide, dénommé SARS-S1, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3020, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 5' de la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 23454 (SEQ ID NO :5), en référence à la séquence Genbank AY274119.3 Tor2,
- le plasmide, dénommé SARS-S2, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3019, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 3'de la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment correspondant aux nucléotides des positions 23322 à 25348 (SEQ ID NO :6), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,
- le plasmide, dénommé SARS-SE, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3126, le, 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15; il contient l'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle région correspondant aux nucléotides des positions 25110 à 26244 (SEQ ID NO :8), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,
- le plasmide, dénommé SARS-E, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3046, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26082 à 26413 (SEQ ID NO :15), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,
- le plasmide, dénommé SARS-M ; compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3047, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus ; laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26330 à 27098 (SEQ ID NO :18), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,
- le plasmide dénommé SARS-MN, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3125, le 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris

EP 1 694 829 B1

Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevée à Hanoi, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26977 à 28218 (SEQ ID NO :20), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

- 5 - le plasmide dénommé SARS-N, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 28054 à 29430 (SEQ ID NO :38), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3 ; ainsi ce plasmide comprend
- 10 un insert de séquence SEQ ID NO :38 et est compris dans une souche bactérienne qui et qu'il a été déposée sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15,
- le plasmide dénommé SARS-5'NC, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I- 3124, le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc correspondant à l'extrémité 5'non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 1 à 204 (SEQ ID NO :39), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,
- le plasmide dénommé SARS-3'NC, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3123 le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15. ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à l'extrémité 3'non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant à celle située entre le nucléotide en position 28933 à 29727 (SEQ ID NO :40), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3, se termine par une série de nucléotides a.,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.3N, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale de la protéine N (SEQ ID NO : 37) avec une étiquette polyhistidine,
- 25 - le plasmide d'expression dénommé pIV2.3S_C, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale du fragment correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression pIV2.3S_L, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale du fragment correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- 30 - le plasmide d'expression dénommé pIV2.4N, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion N-terminale de la protéine N (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.4S_C ou pIV2.4S₁, contenant un insert codant pour une fusion N-terminale du fragment correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine, et
- 35 - le plasmide d'expression dénommé pIV2.4S_L contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion N-terminale du fragment correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine.

40 **[0058]** Selon une disposition avantageuse du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée sous le n° I- 3117, le 23 octobre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

45 **[0059]** Selon une autre disposition avantageuse du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée sous le n° I- 3118, le 23 octobre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

[0060] Selon une autre disposition du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée à la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 sous les numéros suivants :

- 50 a) souche n° I- 3118, déposée le 23 octobre 2003,
- b) souche n° I- 3019, déposée le 12 mai 2003,
- c) souche n° I- 3020, déposée le 12 mai 2003,
- d) souche n° I-3059, déposée le 20 juin 2003,
- e) souche n° I-3323, déposée le 22 novembre 2004,
- 55 f) souche n° I-3324, déposée le 22 novembre 2004,
- g) souche n° I-3326, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- h) souche n° I-3327, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- i) souche n° I-3332, déposée le 1^{er} décembre 2004,

- j) souche n° I-3333, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- k) souche n° I-3334, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- l) souche n° I-3335, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- m) souche n° I-3336, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- n) souche n° I-3337, déposée le 1^{er} décembre 2004,
- o) souche n° I-3338, déposée le 2 décembre 2004,
- p) souche n° I-3339, déposée le 2 décembre 2004,
- q) souche n° I-3340, déposée le 2 décembre 2004,
- r) souche n° I-3341, déposée le 2 décembre 2004.

[0061] Les Inventeurs décrivent également un insérat d'acide nucléique d'origine virale, caractérisé en ce qu'il est contenu dans l'une quelconque des souches telles que définies ci-dessus en a)-r).

[0062] Les Inventeurs décrivent également un acide nucléique comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S dans des cellules eucaryotes, caractérisé en ce qu'il possède la séquence SEQ ID NO: 140.

[0063] Les Inventeurs décrivent également un vecteur d'expression comportant un acide nucléique comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S, lequel vecteur est contenu dans la souche bactérienne déposée à la CNCM, le 1^{er} décembre 2004, sous le n° I-3333.

[0064] Selon un mode de réalisation dudit vecteur d'expression, il s'agit d'un vecteur viral, sous forme de particule virale ou sous forme de génome recombinant.

[0065] Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, il s'agit d'une particule virale recombinante ou d'un génome viral recombinant susceptible d'être obtenu par transfection d'un plasmide selon les alinéas g), h) et k) à r) tels que définis ci-dessus, dans un système cellulaire approprié, c'est-à-dire, par exemple, des cellules transfectées avec un ou plusieurs autres plasmide(s), destinés à trancomplémenter certaines fonctions du virus délétées dans le vecteur et nécessaires à la formation des particules virales.

[0066] On entend ici par « famille de la protéine S » la protéine S complète, son ectodomaine et des fragments de cet ectodomaine qui sont de préférence produits dans un système eucaryote.

[0067] Les Inventeurs décrivent également un vecteur lentiviral codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

[0068] Les Inventeurs décrivent également un virus rougeole recombinant codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

[0069] Les Inventeurs décrivent également un virus vaccine recombinant codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

[0070] Les Inventeurs décrivent également l'utilisation d'un vecteur selon les alinéas e) à r) tels que définis ci-dessus, ou d'un vecteur comportant un gène synthétique de la protéine S, tel que défini ci-dessus, pour la production, en système eucaryote, de la protéine S du coronavirus associé au SRAS, ou d'un fragment de cette protéine.

[0071] Les Inventeurs décrivent également une méthode de production de la protéine S en système eucaryote, comportant une étape de transfection de cellules eucaryotes en culture par un vecteur choisi parmi les vecteurs contenus dans les souches bactériennes mentionnées aux alinéas e) à r) ci-dessus ou un vecteur comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S.

[0072] Les Inventeurs décrivent également une banque d'ADNc caractérisée en ce qu'elle comprend des fragments tels que définis ci-dessus, en particulier des fragments d'amplification ou des fragments de restriction, clonés dans un vecteur recombinant, notamment un vecteur d'expression (banque d'expression).

[0073] Les Inventeurs décrivent également des cellules, notamment des cellules procaryotes, modifiées par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

[0074] Les Inventeurs décrivent également une cellule eucaryote génétiquement modifiée exprimant une protéine ou un polypeptide tels que définis ci-après. Bien évidemment, les termes "cellule eucaryote génétiquement modifiée" ne désignent pas une cellule modifiée par un virus sauvage.

[0075] Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule, elle est susceptible d'être obtenue par transfection par l'un quelconque des vecteurs mentionnés aux alinéas k) à n) ci-dessus.

[0076] Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, il s'agit de la cellule FRhK4-Ssol-30, déposée à la CNCM le 22 novembre 2004, sous le n° I-3325.

[0077] Les vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus et les cellules transformées par lesdits vecteurs d'expression sont avantageusement utilisés pour la production des protéines et des peptides correspondants. Les banques d'expression dérivées desdits vecteurs, ainsi que les cellules transformées par lesdites banques d'expression sont avantageusement utilisées pour identifier les épitopes immunogènes (épitopes B et T) des protéines du coronavirus associé au SRAS.

[0078] Les Inventeurs décrivent également des protéines et des peptides purifiées ou isolées, caractérisés en ce qu'ils

EP 1 694 829 B1

sont codés par le polynucléotide ou l'un de ses fragments tels que définis ci-dessus.

[0079] Selon un mode de réalisation avantageux, ladite protéine est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- la protéine S de séquence SEQ ID NO :3 ou son ectodomaine
- la protéine E de séquence SEQ ID NO :14
- la protéine M de séquence SEQ ID NO :17
- la protéine N de séquence SEQ ID NO : 37
- les protéines codées par les ORFs : ORF1a, ORF1b, ORF3, ORF4 et ORF7 à ORF11, ORF 13 et ORF 14 de séquence respectivement, SEQ ID NO :74, 75, 10, 12, 22, 24, 26, 28, 30, 33 et 35.

[0080] On utilisera ci-après indifféremment les termes « ectodomaine de la protéine S » et « forme soluble de la protéine S ».

[0081] Selon un mode de réalisation avantageux, ledit polypeptide est constitué des acides aminés correspondant aux positions 1 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S

[0082] Selon un autre mode de réalisation avantageux, ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par :

- a) les peptides correspondant aux positions 14 à 1193 et 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S,
- b) les peptides correspondant aux positions 2 à 14 (SEQ ID NO : 69) et 100 à 221 de la séquence en acides aminés de la protéine M ; ces peptides correspondent respectivement à l'ectodomaine et à l'endodomaine de la protéine M, et
- c) les peptides correspondant aux positions 1 à 12 (SEQ ID NO : 70) et 53 à 76 (SEQ ID NO : 71) de la séquence en acides aminés de la protéine E ; ces peptides correspondent respectivement à l'ectodomaine et à l'extrémité C-terminale de la protéine E, et
- d) les peptides de 5 à 50 acides aminés consécutifs, de préférence de 10 à 30 acides aminés, inclus ou chevauchant partiellement ou totalement la séquence des peptides tels que définis en a), b) ou c).

[0083] Les Inventeurs décrivent également un peptide caractérisé en ce qu'il présente une séquence de 7 à 50 acides aminés incluant un résidu d'acide aminé sélectionné dans le groupe constitué par :

- l'alanine située en position 2552 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF1a.
- la sérine située en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus,
- la glycine en position 11 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF3 de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus,
- la sérine en position 154 de la séquence en acides aminés de la protéine M de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus.

[0084] Les Inventeurs décrivent également un anticorps ou un fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal, susceptible d'être obtenu par immunisation d'un animal avec un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, une banque d'ADNc telle que définie ci-dessus ou bien une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il se lie avec l'une au moins des protéines codées par le SARS-CoV telles que définies ci-dessus.

[0085] Les Inventeurs décrivent des anticorps polyclonaux, des anticorps monoclonaux, les anticorps chimériques tels que les anticorps humanisés, ainsi que leurs fragments (Fab, Fv, scFv).

[0086] Les Inventeurs décrivent également un hybridome produisant un anticorps monoclonal contre la protéine N, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les hybridomes suivants :

- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 87, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3328,
- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 86, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3329,
- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 57, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3330, et
- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 156, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3331.

[0087] Les Inventeurs décrivent également un anticorps ou fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre la protéine N, caractérisé en ce qu'il est produit par un hybridome tel que défini ci-dessus.

[0088] On entend par anticorps chimérique, relativement à un anticorps d'une espèce animale particulière ou d'une classe particulière d'anticorps, un anticorps comprenant tout ou partie d'une chaîne lourde et/ou d'une chaîne légère d'un anticorps d'une autre espèce animale ou d'une autre classe d'anticorps.

[0089] On entend par anticorps humanisé une immunoglobuline humaine dans laquelle les résidus des CDRs (*Complementary-Determining Regions*) qui forment le site de liaison à l'antigène sont remplacés par ceux d'un anticorps monoclonal non-humain possédant la spécificité, l'affinité ou l'activité recherchées. Par comparaison avec les anticorps

non-humains, les anticorps humanisés sont moins immunogènes et possèdent une demi-vie prolongée chez l'Homme car ils ne possèdent qu'une faible proportion de séquences non-humaines étant donné que la quasi-totalité des résidus des régions FR (Framework) et de la région constante (Fc) de ces anticorps sont ceux d'une séquence consensus d'immunoglobulines humaines.

5 **[0090]** Les Inventeurs décrivent également une puce ou filtre à protéine, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine, un peptide ou bien un anticorps tels que définis ci-dessus.

[0091] Les puces à protéine sont préparées par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes. Parmi les supports appropriés sur lesquels peuvent être immobilisés des protéines, on peut citer ceux en matière plastique ou en verre, notamment sous la forme de microplaques.

10 **[0092]** La présente invention a également pour objet des réactifs dérivés de la souche isolée de coronavirus associé au SRAS, issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, utiles pour l'étude et le diagnostic de l'infection provoquée par un coronavirus associé au SRAS, lesquels réactifs sont sélectionnés dans le groupe constitué par une souche isolée de coronavirus et un polynucléotide tels que définis ci-dessus.

15 **[0093]** Les Inventeurs décrivent également des réactifs dérivés de la souche isolée de coronavirus associé au SRAS, issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, utiles pour l'étude et le diagnostic de l'infection provoquée par un coronavirus associé au SRAS, lesquels réactifs sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- (a) une paire d'amorces, une sonde ou une puce à ADN telles que définies ci-dessus,
- (b) un vecteur recombinant ou une cellule modifiée tels que définis ci-dessus,
- 20 (c) une protéine ou un peptide tel que défini ci-dessus,
- (d) un anticorps ou fragment d'anticorps tels que définis ci-dessus, et
- (e) une puce à protéine telle que définie ci-dessus.

25 **[0094]** Ces différents réactifs sont préparés et utilisés selon les techniques classiques de biologie moléculaire et d'immunologie, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc., Library of Congress, USA), dans Current Protocols in Immunology (John E. Coligan, 2000, Wiley and Son Inc. Library of Congress, USA) et dans Antibodies : A Laboratory Manual (E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

30 **[0095]** Les fragments d'acide nucléique selon l'invention sont préparés et utilisés selon les techniques classiques telles que définies ci-dessus. Les peptides et les protéines sont préparés par les techniques d'ADN recombinant, connues de l'Homme du métier, notamment à l'aide des vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus. Alternativement, les peptides peuvent être préparés par les techniques classiques de synthèse en phase solide ou liquide, connues de l'Homme du métier.

35 **[0096]** Les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation d'un animal approprié avec une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus, éventuellement couplé à la KLH ou à l'albumine et/ou associé à un adjuvant approprié tel que l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) ou l'hydroxyde d'alumine ; après obtention d'un titre en anticorps satisfaisant, les anticorps sont récoltés par prélèvement du sérum des animaux immunisés et enrichis en IgG par précipitation, selon les techniques classiques, puis les IgG spécifiques des protéines du SARS-CoV sont éventuellement purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne appropriée sur laquelle sont fixés ledit peptide ou ladite protéine,

40 tels que définis ci-dessus, de façon à obtenir une préparation d'IgG monospécifiques.

[0097] Les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un animal immunisé par une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus avec des myélomes, selon la technique de Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497) ; les hybridomes sont cultivés *in vitro*, notamment dans des fermenteurs ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite ; alternativement lesdits anticorps monoclonaux sont produits par génie génétique

45 comme décrit dans le brevet américain US 4,816,567.

[0098] Les anticorps humanisés sont produits par des méthodes générales comme celles décrites dans la Demande Internationale WO 98/45332.

50 **[0099]** Les fragments d'anticorps sont produits à partir des régions V_H et V_L clonées, à partir des ARNm d'hybridomes ou de lymphocytes spléniques d'une souris immunisée ; par exemple, les fragments F_v, scFv ou Fab sont exprimés à la surface de phages filamenteux selon la technique de Winter et Milstein (Nature, 1991, 349, 293-299) ; après plusieurs étapes de sélection, les fragments d'anticorps spécifiques de l'antigène sont isolés et exprimés dans un système d'expression approprié, par les techniques classiques de clonage et d'expression d'ADN recombinant.

[0100] Les anticorps ou leur fragments tels que définis ci-dessus, sont purifiés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que la chromatographie d'affinité.

55 **[0101]** La présente invention a en outre pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par : une souche isolée de coronavirus et un polynucléotide tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un réactif de détection et éventuellement de génotypage/sérotypage, d'un coronavirus associé au SRAS,

[0102] Les Inventeurs décrivent en outre l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par : une paire

d'amorces, une sonde, une puce à ADN, un vecteur recombinant, une cellule modifiée, une protéine ou un peptide, un anticorps ou un fragment d'anticorps et une puce à protéine tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un réactif de détection et éventuellement de génotypage/sérotypage, d'un coronavirus associé au SRAS.

[0103] Les protéines et les peptides, qui sont aptes à être reconnus et/ou à induire la production d'anticorps spécifiques du coronavirus associé au SRAS, sont utiles pour le diagnostic de l'infection par un tel coronavirus ; l'infection est détectée, par une technique appropriée- notamment EIA, ELISA, RIA, immunofluorescence-, à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté.

[0104] Selon une disposition avantageuse de ladite utilisation, lesdites protéines sont sélectionnées dans le groupe constitué par les protéines S, E, M et/ou N et les peptides tels que définis ci-dessus.

[0105] Les protéines S, E, M et/ou N et les peptides dérivés de ces protéines tels que définis ci-dessus, par exemple la protéine N, sont utilisées pour le diagnostic indirect d'une infection à coronavirus associé au SRAS (diagnostic sérologique ; détection d'anticorps spécifiques du SARS-CoV), notamment par une méthode immunoenzymatique (ELISA).

[0106] Les anticorps et les fragments d'anticorps tels que définis ci-dessus, notamment ceux dirigés contre les protéines S, E, M et/ou N et les peptides dérivés tels que définis ci-dessus, sont utiles pour le diagnostic direct d'une infection à coronavirus associé au SRAS ; la détection de protéine(s) du SARS-CoV est réalisée par une technique appropriée, notamment EIA, ELISA, RIA, immunofluorescence à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté.

[0107] Les Inventeurs décrivent également une méthode de détection d'un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, laquelle méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

(a) la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps, une protéine, un peptide ou bien une puce ou un filtre à protéine ou à peptide tels que définis ci-dessus, et

(b) la révélation par tout moyen approprié des complexes antigène-anticorps formés en (a), par exemple par EIA, ELISA, RIA, ou par immunofluorescence.

[0108] Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé l'étape (a) comprend :

(a₁) la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un premier anticorps ou un fragment d'anticorps qui est fixé sur un support approprié, notamment une microplaque,

(a₂) le lavage de la phase solide, et

(a₃) l'addition d'au moins un second anticorps ou un fragment d'anticorps, différent du premier, ledit anticorps ou fragment d'anticorps étant éventuellement marqué de façon appropriée.

[0109] Ce procédé qui permet de capturer les particules virales présentes dans l'échantillon biologique est également dénommé procédé d'immunocapture.

[0110] Par exemple :

- l'étape (a₁) est réalisée avec au moins un premier anticorps monoclonal ou polyclonal ou un fragment de ceux-ci, dirigé contre la protéine S, M, et/ou E, et/ou un peptide correspondant à l'ectodomaine de l'une de ces protéines (peptides M2-14 ou E1-12)

- l'étape (a₃) est réalisée avec au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps dirigé contre un autre épitope de la même protéine ou de préférence contre une autre protéine, de manière préférée contre une protéine interne telle que la nucléoprotéine N ou l'endodomaine de la protéine E ou M, de manière encore plus préférée il s'agit d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre la protéine N qui est très abondante dans la particule virale ; lorsqu'un anticorps ou un fragment d'anticorps dirigé contre une protéine interne (N) ou contre l'endodomaine des protéines E ou M est utilisé, le dit anticorps est incubé en présence de détergent, comme le Tween 20 par exemple, à des concentrations de l'ordre de 0,1 %.

- l'étape (b) de révélation des complexes antigène-anticorps formés est réalisée, soit directement à l'aide d'un second anticorps marqué par exemple avec de la biotine ou une enzyme appropriée telle que la peroxydase ou la phosphatase alcaline, soit indirectement à l'aide d'un sérum anti-immunoglobulines marqué comme ci-dessus. Les complexes ainsi formés sont révélés à l'aide d'un substrat approprié.

[0111] Selon une mise en oeuvre préférée de cet aspect de l'invention, l'échantillon biologique est mélangé à l'anticorps monoclonal de révélation préalablement à sa mise en contact avec les anticorps monoclonaux de capture. Le cas échéant, le mélange sérum-anticorps de révélation est incubé pendant au moins 10 minutes à température ambiante avant d'être appliqué sur la plaque.

[0112] La présente invention a également pour objet un test d'immunocapture destiné à détecter une infection par le

EP 1 694 829 B1

coronavirus associé au SRAS par détection de la nucléoprotéine native (protéine N), en particulier caractérisé en ce que l'anticorps utilisé pour la capture de la nucléoprotéine virale native est un anticorps monoclonal spécifique de la région centrale et/ou d'un épitope conformationnel.

[0113] Selon un mode de réalisation dudit test, l'anticorps utilisé pour la capture de la protéine N est l'anticorps monoclonal Acm87, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3328.

[0114] Selon un autre mode de réalisation dudit test d'immunocapture, l'anticorps utilisé pour la capture de la protéine N est l'anticorps monoclonal Acm86, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3329.

[0115] Selon un autre mode de réalisation dudit test d'immunocapture, les anticorps monoclonaux Acm86 et Acm87 sont utilisés pour la capture de la protéine N.

[0116] Dans les tests d'immunocapture selon l'invention, on peut utiliser pour la révélation de la protéine N, l'anticorps monoclonal Acm57, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004 sous le numéro I-3330, ledit anticorps étant conjugué à une molécule ou une particule révélatrice.

[0117] Conformément audit test d'immunocapture, une combinaison des anticorps Acm57 et Acm87, conjugués à une molécule ou une particule révélatrice, est utilisée pour la révélation de la protéine N.

[0118] Une molécule révélatrice peut être un atome radioactif, un colorant, une molécule fluorescente, un fluorophore, une enzyme ; une particule révélatrice peut être, par exemple : de l'or colloïdal, une particule magnétique ou une bille de latex.

[0119] La présente invention a également pour objet un réactif de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par une souche isolée de coronavirus telle que définie ci-dessus et un polynucléotide tel que défini ci-dessus.

[0120] Les Inventeurs décrivent également un réactif de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- (a) une paire d'amorces ou une sonde telles que définies ci-dessus,
- (b) un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus ou une cellule modifiée telle que définie ci-dessus,
- (c) un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-dessus,
- (d) une combinaison d'anticorps comprenant les anticorps monoclonaux Acm86 et/ou Acm87, et l'anticorps monoclonal Acm57, telle que définie ci-dessus,
- (e) une puce ou un filtre tels que définis ci-dessus.

[0121] Les Inventeurs décrivent également une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, par ELISA IgG indirect utilisant la protéine N, laquelle méthode est caractérisée en ce que les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à une concentration comprise entre 0,5 et 4 µg/mL, de préférence 2 µg/mL, dans un tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L.

[0122] Les Inventeurs décrivent, en outre, une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, par ELISA double épitope, caractérisée en ce que le sérum à tester est mélangé à l'antigène de révélation, ledit mélange étant ensuite mis au contact de l'antigène fixé sur un support solide.

[0123] Selon une variante des tests de détection des coronavirus associé au SRAS, ces tests combinent un ELSA utilisant la protéine N, et un autre ELSA utilisant la protéine S, tel que décrit plus bas.

[0124] Les Inventeurs décrivent aussi un complexe immunitaire formé d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal tel que défini ci-dessus, et d'une protéine ou d'un peptide du coronavirus associé au SRAS.

[0125] La présente invention a en outre pour objet un kit de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par une souche isolée de coronavirus et un polynucléotide.

[0126] Les Inventeurs décrivent en outre un kit de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par : une paire d'amorces, une sonde, une puce à ADN ou à ARN, un vecteur recombinant, une cellule modifiée, une protéine ou un peptide, un anticorps, et une puce à protéine tels que définis ci-dessus.

[0127] Les Inventeurs décrivent en outre, une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné dans le groupe constitué par :

- a) une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus,
- b) un polynucléotide de type ADN ou ARN ou l'un de ses fragments représentatifs tels que définis ci-dessus, de séquence choisie parmi :

(i) la séquence SEQ ID NO : 1 ou son équivalent ARN

(ii) la séquence hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1,

- (iii) la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO : 1 ou de la séquence hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1,
- (iv) la séquence nucléotidique d'un fragment représentatif du polynucléotide tel que défini en (i), (ii) ou (iii),
- (v) la séquence telle que définie en (i), (ii), (iii) ou (iv), modifiée, et

5

- c) un vecteur d'expression recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini en b), et
- d) une banque d'ADNc telle que définie ci-dessus,

10

ladite composition immunogène étant capable d'induire une immunité humorale ou cellulaire protectrice spécifique du coronavirus associé au SRAS, notamment la production d'un anticorps dirigé contre un épitope spécifique du coronavirus associé au SRAS.

15

[0128] Les protéines et les peptides tels que définis ci-dessus, notamment les protéines S, M, E et/ou N et les peptides dérivés, ainsi que les molécules d'acide nucléique (ADN ou ARN) codant lesdites protéines ou lesdits peptides, sont de bons candidats vaccin et peuvent être utilisées dans des compositions immunogènes pour la production d'un vaccin contre le coronavirus associé au SRAS.

20

[0129] Selon un mode de réalisation avantageux des compositions définies ci-dessus, elles contiennent en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement des substances porteuses et/ou des adjuvants.

[0130] Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

25

[0131] Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué par des émulsions huileuses, de la saponine, des substances minérales, des extraits bactériens, de l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

[0132] Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par des liposomes unilamellaires, des liposomes multilamellaires, des micelles de saponine ou des microsphères solides de nature saccharidique ou aurifère.

30

[0133] Les compositions telles que définies ci-dessus, sont administrées par voie générale, notamment intramusculaire ou sous-cutanée ou bien par voie locale notamment nasale (aérosol).

[0134] Les Inventeurs décrivent également l'utilisation d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75 pour former un complexe immun avec un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

35

[0135] Les Inventeurs décrivent également un complexe immun formé d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75, et d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

40

[0136] Les Inventeurs décrivent également l'utilisation d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75 pour induire la production d'un anticorps capable de reconnaître spécifiquement un épitope du coronavirus associé au SRAS.

[0137] Les Inventeurs décrivent également l'utilisation d'un polynucléotide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 1, 2, 4, 7, 8, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 31, 36 et 38 pour induire la production d'un anticorps dirigé contre la protéine codée par ledit polynucléotide et capable de reconnaître spécifiquement un épitope du coronavirus associé au SRAS

45

[0138] Les Inventeurs décrivent également des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine S native d'un coronavirus associé au SRAS.

[0139] Les Inventeurs décrivent également l'utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, ou d'un anticorps reconnaissant la protéine S native, tel que défini ci-dessus, pour détecter une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique.

50

[0140] Les Inventeurs décrivent également une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, caractérisée en ce que la détection est effectuée par ELISA utilisant la protéine S recombinante, exprimée dans un système eucaryote.

[0141] Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode, il s'agit d'une méthode par ELISA double épitope, et le sérum à tester est mélangé à l'antigène de révélation, ledit mélange étant ensuite mis au contact de l'antigène fixé sur un support solide.

55

[0142] Les Inventeurs décrivent aussi un complexe immun formé d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps monoclonal reconnaissant la protéine S native, et d'une protéine ou d'un peptide du coronavirus associé au SRAS.

[0143] Les Inventeurs décrivent également un complexe immun formé d'une protéine ou d'un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, et d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

EP 1 694 829 B1

[0144] Les Inventeurs décrivent en outre un kit ou coffret de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par : une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, un acide nucléique codant pour une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, une cellule exprimant une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, ou un anticorps reconnaissant la protéine S native d'un coronavirus associé au SRAS.

[0145] Les Inventeurs décrivent une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ou une protéine recombinante de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, obtenu dans un système d'expression eucaryote.

[0146] Les Inventeurs décrivent également une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur ou virus recombinant, exprimant une protéine ou un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

[0147] Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du polynucléotide représentant le génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589, et des fragments d'ADNc dérivés objets de la présente invention, ainsi qu'au Tableau I présentant la liste des séquences :

Tableau I : Liste des séquences

numéro d'identification	Séquence	Position de l'ADNc en référence à Genbank AY274119.3	Numéro de dépôt à la CNCM du plasmide correspondant
SEQ ID NO : 1	génomme de la souche issue du prélèvement 031589	-	-
SEQ ID NO : 2	ORF-S*	21406-25348	-
SEQ ID NO : 3	Protéine S	-	-
SEQ ID NO : 4	ORF-S**	21406-25348	I-3059
SEQ ID NO : 5	fragment Sa	21406-23454	I-3020
SEQ ID NO : 6	fragment Sb	23322-25348	I-3019
SEQ ID NO : 7	ORF-3+ORF-4*	25110-26244	-
SEQ ID NO : 8	ORF-3+ORF-4**	25110-26244	I-3126
SEQ ID NO : 9	ORF3	-	-
SEQ ID NO : 10	Protéine ORF-3	-	-
SEQ ID NO : 11	ORF4	-	-
SEQ ID NO : 12	Protéine ORF-4	-	-
SEQ ID NO : 13	ORF-E*	26082-26413	-
SEQ ID NO : 14	Protéine E	-	-
SEQ ID NO : 15	ORF-E**	26082-26413	I-3046
SEQ ID NO : 16	ORF-M*	26330-27098	-
SEQ ID NO : 17	Protéine M	-	-
SEQ ID NO : 18	ORF-M**	26330-27098	I-3047
SEQ ID NO : 19	ORF7 à 11*	26977-28218	-
SEQ ID NO : 20	ORF7 à 11**	26977-28218	I-3125
SEQ ID NO : 21	ORF7	-	-
SEQ ID NO : 22	Protéine ORF7	-	-
SEQ ID NO : 23	ORF8	-	-

EP 1 694 829 B1

(suite)

numéro d'identification	Séquence	Position de l'ADNc en référence à Genbank AY274119.3	Numéro de dépôt à la CNCM du plasmide correspondant
5	SEQ ID NO : 24	Protéine ORF8	-
	SEQ ID NO : 25	ORF9	-
	SEQ ID NO : 26	Protéine ORF9	-
10	SEQ ID NO : 27	ORF10	-
	SEQ ID NO : 28	Protéine ORF10	-
	SEQ ID NO : 29	ORF11	-
15	SEQ ID NO : 30	Protéine ORF11	-
	SEQ ID NO: 31	OrF1ab	265-21485
	SEQ ID NO : 32	ORF13	28130-28426
	SEQ ID NO : 33	Protéine ORF13	-
20	SEQ ID NO : 34	ORF14	-
	SEQ ID NO : 35	Protéine ORF14	28583-28795
	SEQ ID NO : 36	ORF-N*	28054-29430
25	SEQ ID NO : 37	Protéine N	-
	SEQ ID NO : 38	ORF-N**	28054-29430
	SEQ ID NO : 39	5'non-codante**	1-204
	SEQ ID NO : 40	3'non-codante**	28933-29727
30		ORF1ab	-
	SEQ ID NO : 41	Fragment L0	30-500
	SEQ ID NO : 42	Fragment L1	211-2260
35	SEQ ID NO : 43	Fragment L2	2136-4187
	SEQ ID NO : 44	Fragment L3	3892-5344
	SEQ ID NO : 45	Fragment L4b	4932-6043
	SEQ ID NO : 46	Fragment L4	5305-7318
40	SEQ ID NO : 47	Fragment L5	7275-9176
	SEQ ID NO : 48	Fragment L6	9032-11086
	SEQ ID NO : 49	Fragment L7	10298-12982
45	SEQ ID NO : 50	Fragment L8	12815-14854
	SEQ ID NO : 51	Fragment L9	14745-16646
	SEQ ID NO : 52	Fragment L10	16514-18590
	SEQ ID NO : 53	Fragment L11	18500-20602
50	SEQ ID NO : 54	Fragment L12	20319-22224
	SEQ ID NO : 55	Amorce N sens	-
	SEQ ID NO : 56	Amorce N antisens	-
55	SEQ ID NO : 57	Amorce S _C sens	-
	SEQ ID NO : 58	Amorce S _L sens	-
	SEQ ID NO : 59	Amorce S _C e t S _L antisens	-

EP 1 694 829 B1

(suite)

numéro d'identification	Séquence	Position de l'ADNc en référence à Genbank AY274119.3	Numéro de dépôt à la CNCM du plasmide correspondant	
5	SEQ ID NO : 60	Amorce sens série 1	28507-28522	-
	SEQ ID NO : 61	Amorce antisens série 1	28774-28759	
	SEQ ID NO : 62	Amorce sens série 2	28375-28390	-
10	SEQ ID NO : 63	Amorce antisens série 2	28702-28687	-
	SEQ ID NO : 64	Sonde 1/série 1	28561-28586	-
	SEQ ID NO : 65	Sonde 2/série 1	28588-28608	-
15	SEQ ID NO : 66	Sonde 1/série 2	28541-28563	-
	SEQ ID NO : 67	Sonde 2/série 2	28565-28589	-
	SEQ ID NO : 68	Amorce ancre 14T		
	SEQ ID NO : 69	Peptide M2-14	-	-
20	SEQ ID NO : 70	Peptide E1-12	-	-
	SEQ ID NO : 71	Peptide E53-76	-	-
	SEQ ID NO : 72	5'non-codante*	1-204	-
25	SEQ ID NO : 73	3'non-codante*	28933-29727	-
	SEQ ID NO : 74	Protéine ORF1a	-	-
	SEQ ID NO : 75	Protéine ORF1b	-	-
	SEQ ID NO:76-139	Amorces		
30	SEQ ID NO:140	Pseudogène de S		
	SEQ ID NO:141-148	amorces		
	SEQ ID NO:149	Aa1-13 de S		
35	SEQ ID NO:150	polypeptide		
	SEQ ID NO:151-158	amorces		
40				
45	* produit d'amplification PCR (amplicon)			
	** insert cloné dans le plasmide déposé à la CNCM ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :			

- la figure 1 illustre l'analyse par Western-blot de l'expression *in vitro* des protéines recombinantes N, S_C et S_L à partir des vecteurs d'expression pIVEX. Piste 1 : pIV2.3N. Piste 2 : pIV2.3S_C. Piste 3 : pIV2.3S_L. Piste 4 : pIV2.4N. Piste 5 : pIV2.4S₁ ou pIV2.4S_C. Piste 6 : pIV2.4S_L. L'expression de la protéine GFP exprimée à partir du même vecteur est utilisée comme contrôle.
- la figure 2 illustre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie, de l'expression *in vivo* de la protéine N à partir des vecteurs d'expression pIVEX. La souche d'*E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants est cultivée à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). Piste 1 : pIV2.3N Piste 2 : pIV2.4N.
- la figure 3 illustre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie, de l'expression *in vivo* des polypeptides S_L et S_C à partir des vecteurs d'expression pIVEX. La souche d'*E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants est cultivée

EP 1 694 829 B1

à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). Piste 1 : pIV2.3S_C Piste 2 : pIV2.3S_L. Piste 3 : pIV2.4S₁ Piste 4 : pIV2.4S_L.

- la figure 4 illustre l'activité antigénique des protéines N, S_L et S_C recombinantes produites dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants. A : électrophorèse (SDS-PAGE) des lysats bactériens. B et C : Western-blot avec les sérums, provenant d'un même patient infecté par le SARS-CoV, prélevés respectivement 8 jours (B : sérum M12) et 29 jours-(C : sérum M13) après le début des symptômes du SRAS. Piste 1 : pIV2.3N. Piste 2 : pIV2.4N. Piste 3 : pIV2.3S_C. Piste 4 : pIV2.4 S₁. Piste 5 : pIV2.3S_L. Piste 6 : pIV2.4S_L
- la figure 5 illustre la purification sur colonne Ni-NTA agarose de la protéine N recombinante produite dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 à partir du vecteur pIV2.3N. Piste 1 : Extrait bactérien total. Piste 2 : Extrait soluble. Piste 3 : Extrait insoluble. Piste 4 : Extrait déposé sur la colonne Ni-NTA. Piste 5 : protéines non-retenues. Piste 6 : Fractions du pic 1. Piste 7 : Fractions du pic 2.
- la figure 6 illustre la purification de la protéine S_C recombinante à partir des corps d'inclusions produits dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par le pIV2.4S₁.A. Traitement au Triton X-100 (2%) : Piste 1 : Extrait bactérien total. Piste 2 : Extrait soluble. Piste 3 : Extrait insoluble. Piste 4 : Surnageant après traitement au Triton X-100 (2 %). Pistes 5 et 6 : Culot après traitement au Triton X-100 (2 %).B : Traitement à l'urée 4M, 5M, 6M et 7M des extraits solubles et insolubles.
- la figure 7 représente l'immunoempreinte réalisée à l'aide d'un lysat de cellules infectées par le SARS-CoV et d'un sérum de patient atteint de pneumopathie atypique.
- la figure 8 représente des immunoempreintes réalisées à l'aide d'un lysat de cellules infectées par le SARS-CoV et d'immunsérums de lapins spécifiques de la nucléoprotéine N (A) et de la protéine de spicule S (B). I.S. : sérum immun. p.i. : sérum pré-immun. L'immunsérum anti-N a été utilisé au 1/50000 et l'immunsérum anti-S au 1/10000.
- la figure 9 illustre la réactivité en ELISA des sérums polyclonaux monospécifiques de lapin dirigés contre la protéine N ou le fragment court de la protéine S (S_C), vis-à-vis des protéines recombinantes correspondantes utilisées pour l'immunisation. A : lapins P13097, P13081, et P13031 immunisés avec la protéine N recombinante purifiée. B : lapins P11135, P13042, et P14001 immunisés avec une préparation de corps d'inclusions correspondants au fragment court de la protéine S (S_C). I.S. : sérum immun. p.i. : sérum pré-immun.
- la figure 10 illustre la réactivité en ELISA de la protéine N recombinante purifiée, vis-à-vis de sérum de patients atteints de pneumonie atypique causée par le SARS-CoV. Figure 10a : plaques ELISA préparés avec la protéine N à la concentration de 4 µg/ml et 2 µg/ml. Figure 10b : plaque ELISA préparée avec la protéine N à la concentration de 1 µg/ml. Les sérums désignés A, B, D, E, F, G, H correspondent à ceux du Tableau IV.
- la figure 11 illustre l'amplification par RT-PCR de quantités décroissantes d'ARN synthétique du gène N du SARS-CoV (10⁷ à 1 copie), à l'aide des couples d'amorces n° 1 (N/+28507,N/-28774) (A) et n° 2 (N/+28375,N/-28702) (B). T : amplification réalisée en l'absence d'ARN. MW : marqueur d'ADN.
- la figure 12 illustre l'amplification par RT-PCR en temps réel d'ARN synthétique du gène N du SARS-CoV : des quantités décroissantes d'ARN synthétique en répliquat (repli. ; pistes 16 à 29) ainsi que de l'ARN viral dilué au 1/20x10⁻⁴ (piste 32) ont été amplifiés par RT-PCR en temps réel à l'aide du kit "Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes" et des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2, dans les conditions décrites à l'exemple 8.
- la figure 13.1 à 13.70 (figure 13.1 à 13.70) représente la carte de restriction de la séquence SEQ ID NO : 1 correspondant à l'équivalent ADN du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589.
- la figure 14 montre le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N indirect (1ère série de sérums testés)
- la figure 15 montre le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N indirect (2ème série de sérums testés)
- la figure 16 présente le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N double épitope (1 ère série de sérums testés)
- la figure 17 montre le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N double épitope (2ème série de sérums testés)
- la figure 18 illustre le test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N par ELISA sur la nucléoprotéine N native du SRAS-CoV. Les anticorps ont été testés sous la forme de surnageants de culture d'hybridomes par un ELISA indirect utilisant un lysat irradié de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène (courbes lysat SRAS). Un contrôle négatif de réactivité est réalisé pour chaque anticorps sur un lysat de cellules VeroE6 non infectées (courbes lysat négatif). Plusieurs anticorps monoclonaux de spécificité connue ont été utilisés comme anticorps témoins négatifs : para1-3 dirigé contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad) et grippe B dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad).
- la figure 19 illustre le test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N du SRAS-CoV par ELISA sur les antigènes natifs du coronavirus humain 229E (HCoV-229E). Les anticorps ont été testés sous la forme de surnageants de culture d'hybridomes par un test ELISA indirect utilisant un lysat de cellules MRC-5 infectées par le coronavirus humain 229E comme antigène (courbes lysat 229E). Un contrôle négatif d'immunoréactivité est réalisé pour chaque anticorps sur un lysat de cellules MRC-5 non infectées (courbes lysat négatif). L'anticorps monoclonal 5-11H.6 dirigé contre la protéine S du coronavirus humain 229E (Sizun et al. 1998, J. Virol. Met. 72 : 145-152) est utilisé

EP 1 694 829 B1

comme anticorps témoin positif. Les anticorps para-3 dirigé contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad) et grippe B dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad) ont été ajoutés au panel des anticorps monoclonaux testés.

- la figure 20 montre un test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N du SRAS-CoV par western blot sur la nucléoprotéine N native du SRAS-CoV dénaturée. Un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV a été préparé dans le tampon de dépôt selon Laemmli et mis à migrer dans un gel SDS à 12% de polyacrylamide puis les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. Les anticorps monoclonaux anti-N testés ont été utilisés pour l'immunoessai à la concentration de 0.05 µg/ml. La révélation est faite avec des anticorps anti-IgG(H+L) de souris couplés à la peroxydase (NA93IV, Amersham) et le système ECL+. Deux anticorps monoclonaux ont été utilisés comme témoins négatifs de réactivité : grippe B dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad) et para-1-3 dirigé contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad).
- la figure 21 présente les plasmides d'expression en cellules de mammifères de la protéine S du SRAS-CoV. Le cDNA de la S du SRAS-CoV a été inséré entre les sites BamH1 et Xho1 du plasmide d'expression pcDNA3.1(+) (Clontech) pour obtenir le plasmide pcDNA-S et entre les sites Nhe1 et Xho1 du plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-S. Les séquences WPRE et CTE ont été insérées dans chacun des deux plasmides pcDNA-S et pCI-S entre les sites Xho1 et Xba1 pour obtenir respectivement les plasmides pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

SP : peptide signal prédit (aa 1-13) avec le logiciel signalP v2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering, 10 : 1-6)
TM : région transmembranaire prédite (aa 1196-1218) avec le logiciel TMHMM v2.0 (Sonnhammer et al., 1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182, AAAI Press). Il faut noter que les acides aminés W1194 et P1195 font possiblement partie de la région transmembranaire avec des probabilités respectives de 0,13 et 0,42

P-CMV : promoteur immédiat/précoce du cytomégalovirus. BGH pA : signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine

SV40 late pA : signal de polyadénylation tardif du virus SV40

SD/SA : sites donneur et accepteur d'épissage

WPRE : séquences du "Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element" du virus de l'hépatite de la marmotte

CTE : séquences du "constitutive transport element" du rétrovirus simien de Mason-Pfizer

- la figure 22 illustre l'expression de la protéine S après transfection de cellules VeroE6. Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 par les plasmides pcDNA, pcDNA-S, pCI et pCI-S. Des extraits cellulaires ont également été préparés 18 heures après infection par le virus recombinant de la vaccine VV-TF7.3 et transfection par les plasmides pcDNA ou pcDNA-S. A titre de contrôle, des extraits de cellules VeroE6 ont été préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3. Ils ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxydase (NA934V, Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV

Mock : extrait contrôle de cellules non infectées

- la figure 23 illustre l'effet des séquences CTE et WPRE sur l'expression de la protéine S après transfection de cellules VeroE6 et 293T. Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 (A) ou 293T (B) par les plasmides pcDNA, pcDNA-S, pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE, séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxydase (NA934V, Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3.

Mock : extrait contrôle de cellules VeroE6 non infectées

- la figure 24 présente des vecteurs lentiviraux défectifs à DNA flap central pour l'expression de la S du SRAS-CoV. Le cADN de la protéine S du SRAS-CoV a été cloné sous la forme d'un fragment BamH1-Xho1 dans le plasmide pTRIPΔU3-CMV contenant un vecteur lentiviral défectif TRIP à DNA flap central (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 : 438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S. Les cassettes d'expression optimales constituées du promoteur immé-

EP 1 694 829 B1

diat/précoce du virus CMV, d'un signal d'épissage, du cDNA de la S et de l'un ou l'autre des signaux post-transcriptionnels CTE ou WPRE ont été substituées à la cassette EF1 α -EGFP du vecteur d'expression lentiviral défectif à DNA FLAP central TRIP Δ U3-EF1 α (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 :438-448) pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-S-CTE et pTRIP-SD/SA-S-WPRE.

- 5
- SP : peptide signal
TM : région transmembranaire
P-CMV : promoteur immédiat/précoce du cytomégalo virus
P-EF1 α : promoteur du gène EF1 α
- 10
- SD/SA : sites donneur et accepteur d'épissage
WPRE : séquences du "Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element" du virus de l'hépatite de la marmotte
CTE : séquences du "constitutive transport element" du rétrovirus simien de Mason-Pfizer
LTR : « Long terminal repeat »
- 15
- Δ U3 : LTR délété des séquences « promoter/enhancer »
cPPT : « polypurine tract cis-active sequence »
CTS : « central termination sequence »

- 20
- la figure 25 montre l'analyse par western blot de l'expression de la S du SRAS-CoV par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-S-WPRE et TRIP-SD/SA-S-CTE. Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de lignées FrhK4-S-CTE et FrhK4-S-WPRE établies après transduction par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-S-CTE et TRIP-SD/SA-S-WPRE respectivement. Ils ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase. Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

- 25
- T- : extrait contrôle de cellules FrhK-4
T+ : extrait de cellules FrhK-4 préparées 24h après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3.

- 30
- la figure 26 concerne l'analyse de l'expression de polypeptide Ssol par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. La sécrétion du polypeptide Ssol a été recherchée dans le surnageant d'une série de clones cellulaires isolés après transduction de cellules FRhK-4 par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. 5 μ l de surnageant dilués au 1/2 dans du tampon de dépôt selon Laemmli ont été analysés par western blot révélé par un anticorps monoclonal anti-FLAG (M2, Sigma) et un conjugué anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase. T- : surnageant de la lignée FRhK-4 parentale. T+ : surnageant de cellules BHK infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant le polypeptide Ssol. La flèche pleine indique le polypeptide Ssol, tandis que la flèche creuse indique une réaction croisée avec une protéine d'origine cellulaire.

- 35
- la figure 27 montre les résultats relatifs à l'analyse du polypeptide Ssol purifié
- 40
- A. 8, 2, 0.5 et 0.125 μ g de polypeptide recombinant Ssol purifié par chromatographie d'affinité anti-FLAG et gel filtration (G75) ont été séparés sur gel SDS à 8% de polyacrylamide. Le polypeptide Ssol ainsi que des quantités variables de marqueurs de masse moléculaire (MM) ont été révélés par coloration au nitrate d'argent (Gelcode SilverSNAP stain kit II, Pierce).

- 45
- B. Marqueurs étalons pour l'analyse par spectrométrie de masse SELDI-TOF

IgG : IgG bovine de MM 147300
ConA : conalbumine de MM 77490
HRP : peroxydase de raifort analysée à titre de contrôle et de MM 43240

- 50
- C. Analyse par spectrométrie de masse (SELDI-TOF) du polypeptide recombinant Ssol.

Les pics A et B correspondent au polypeptide Ssol simplement et doublement chargé.

- 55
- D. Séquençage de l'extrémité N-terminale du polypeptide recombinant Ssol. 5 cycles de dégradation d'Edman en phase liquide ont été réalisés sur un séquenceur ABI494 (Applied Biosystems).

- la figure 28 illustre l'influence d'un signal d'épissage et des séquences CTE et WPRE sur l'efficacité de l'immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique codant la S du SRAS-CoV

EP 1 694 829 B1

A. Des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pcDNA-S, pCI-S, pcDNA-N et pCI-HA.

B. Des groupes de 6 souris BALB/c ont été immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 2 µg, 10 µg ou 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

5

Les sérums immuns prélevés 3 semaines après la deuxième immunisation ont été analysés par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB (KPL).

10 - la figure 29 montre la séroneutralisation de l'infektivité du SRAS-CoV par les anticorps induits chez la souris après immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique codant la S du SRAS-CoV. Des pools de sérums immuns prélevés 3 semaines après la deuxième immunisation ont été réalisés pour chacun des groupes des expériences décrites dans la figure 28 et évalués pour leur capacité à séroneutraliser l'infektivité de 100 TCID₅₀ du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infektivité de 2 cupules sur 4.

15

A. Groupes de souris BALB/c immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pcDNA-S, pCI-S, pcDNA-N et pCI-HA. □ : sérum préimmun. ■ : sérum immun.

20

B. Groupes de souris BALB/c immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 2 µg, 10 µg ou 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

- la figure 30 illustre l'immunoréactivité du polypeptide recombinant Ssol vis à vis de sérums de patients atteints de SRAS. La réactivité de sérums de patients a été analysée par test ELISA indirect contre des phases solides préparées à l'aide du polypeptide recombinant Ssol purifié. Les anticorps de patients réagissant avec la phase solide à une dilution de 1/400 sont révélés par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) humain couplé à la peroxidase (Amersham NA933V) et du TMB plus H₂O₂ (KPL). Les sérums de cas probables de SRAS sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes, le cas échéant. Les sérums TV sont des sérums témoins de sujets qui ont été prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

25

- La figure 31 montre l'induction d'anticorps dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation avec le polypeptide recombinant Ssol. Deux groupe de 6 souris ont été immunisés à 3 semaines d'intervalle avec 10 µg de polypeptide recombinant Ssol (groupe Ssol) adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium ou, à titre de contrôle, de l'adjuvant seul (groupe mock). Trois immunisations successives ont été réalisées et les sérums immuns ont été prélevés 3 semaines après chacune des trois immunisations (IS1, IS2, IS3). Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (Amersham) et du TMB (KPL).

35

- La figure 32 présente l'alignement nucléotidique des séquences du gène synthétique 040530 avec la séquence du gène sauvage de l'isolat 031589 du SRAS-CoV. I-3059 correspond aux nucléotides 21406-25348 de l'isolat 031589 du SRAS-CoV déposé à la C.N.C.M. sous le numéro I-3059 (SEQ ID NO : 4, plasmide pSRAS-S). S-040530 est la séquence du gène synthétique 040530.

40

- la figure 33 illustre l'utilisation d'un gène synthétique pour l'expression de la S du SRAS-CoV. Des extraits cellulaires préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 (A) ou 293T (B) par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression de la protéine S ont été mesurés en quantifiant les 2 bandes majoritaires repérées sur l'image.

45

- la figure 34 présente un schéma de la construction des virus vaccine recombinants VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN-S et VV-TN-Ssol

50

A. Les cDNA de la protéine S et du polypeptide Ssol du SRAS-CoV ont été inséré entre les sites BamH1 et Sma1 du plasmide de transfert pTG186 pour obtenir les plasmides pTG-S et pTG-Ssol.

55

B. Les séquences du promoteur synthétique 480 ont ensuite été substituées à celles du promoteur 7.5 par échange du fragment Nde1-Pst1 des plasmides pTG186poly, pTG-S et pTG-Ssol pour obtenir les plasmides de transfert pTN480, pTN-S et pTN-Ssol.

EP 1 694 829 B1

C. Séquence du promoteur synthétique 480 tel que contenu entre les sites Nde1 et Pst1 des plasmides de transfert de la série pTN. Un site Asc1 a été inséré pour faciliter les manipulations ultérieures. Les sites de restriction ainsi que la séquence du promoteur sont soulignés

D. Les virus recombinants de la vaccine sont obtenus par double recombinaison homologue *in vivo* entre la cassette TK des plasmides de transfert des séries pTG et pTN et le gène TK de la souche Copenhague du virus de la vaccine.

SP : peptide signal prédit (aa 1-13) avec le logiciel signalP v2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering, 10 : 1-6)

TM : région transmembranaire prédite (aa 1196-1218) avec le logiciel TMHMM v2.0 (Sonnhammer et al., 1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182, AAAI Press). Il faut noter que les acides aminés W1194 et P1195 font possiblement partie de la région transmembranaire avec des probabilités respectives de 0,13 et 0,42.

TK-L, TK-R : parties gauche et droite du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine

MCS : site multiple de clonage

PE : promoteur précoce

PL : promoteur tardif

PL synth : promoteur tardif synthétique 480

- la figure 35 illustre l'expression de la protéine S par les virus vaccine recombinants, analysée par western blot. Des extraits cellulaires ont été préparés 18 heures après infection de cellules CV1 par les virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S et VV-TN-S à une M.O.I. de 2 (A). A titre de contrôle, des extraits de cellules VeroE6 ont été préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 2. Des extraits cellulaires ont également été préparés 18 heures après infection de cellules CV1 par les virus vaccine recombinants VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol (B). Ils ont été séparés sur des gels SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). « 1µl » et « 10µl » indique les quantités d'extraits cellulaires déposées sur le gel. Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV

Mock : extrait contrôle de cellules non infectées

- la figure 36 montre le résultat d'une analyse par western blot de la sécrétion du polypeptide Ssol par les virus vaccine recombinants.

A. Des surnageants de cellules CV1 infectées par le virus vaccine recombinant VV-TN, différents clones du virus VV-TN-Ssol et par les virus VV-TG-Ssol ou VV-TN-Sflag ont été récoltés 18 heures après infection de cellules CV1 à une M.O.I. de 2.

B. Des surnageants de cellules 293T, FRhK-4, BHK-21 et CV1 infectées en dupliqués (1,2) par le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol à une M.O.I. de 2 ont été récoltés 18 heures après infection. Le surnageant de cellules CV1 infectées par le virus VV-TN a également été récolté à titre de contrôle (M).

Tous les surnageants ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide selon Laemmli et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-FLAG et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) (A) ou à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham) (B).

Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

- la figure 37 montre l'analyse du polypeptide Ssol, purifié par gel SDS de polyacrylamide

10, 5 et 2 µl de polypeptide recombinant Ssol purifié par chromatographie d'affinité anti-FLAG ont été séparés sur gel SDS en gradient de 4 à 15 % de polyacrylamide. Le polypeptide Ssol ainsi que des quantités variables de marqueurs de masse moléculaire (MM) ont été révélés par coloration au nitrate d'argent (Gelcode SilverSNAP stain kit II, Pierce).

- la figure 38 illustre l'immunoréactivité du polypeptide recombinant Ssol produit par le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS. La réactivité de sérums de patients a été analysée par test ELISA indirect contre des phases solides préparées à l'aide du polypeptide recombinant Ssol purifié. Les anticorps de patients réagissant avec la phase solide à une dilution de 1/100 et 1/400 sont révélés par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) humain couplé à la peroxidase (Amersham NA933V) et du TMB plus H₂O₂ (KPL). Les

EP 1 694 829 B1

sérums de cas probables de SRAS sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes, le cas échéant. Les sérums TV sont des sérums témoins de sujets qui ont été prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

- 5 - la figure 39 montre la réponse en anticorps anti-SRAS-CoV chez la souris après immunisation par les virus vaccine recombinants. Des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés par voie i.v. à deux reprises à 4 semaines d'intervalle par 106 u.f.p. de virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-HA, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S, VV-TN-Ssol.

10 A. Des pools de sérums immuns prélevés 3 semaines après chacune des deux immunisations ont été réalisés pour chacun des groupes et ont été analysés par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB (KPL).

15 B. Les pools de sérums immuns ont été évalués pour leur capacité à séroneutraliser l'infektivité de 100 TCID₅₀ du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infektivité de 2 cupules sur 4.

- 20 - la figure 40 décrit la construction des virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol.

25 A. Le vecteur rougeole est un génome complet de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) dans lequel une unité de transcription supplémentaire a été introduite (Combredet, 2003, Journal of Virology, 77 : 11546-11554). L'expression des phases ouvertes de lecture (ORF) supplémentaires est contrôlée par les éléments agissant en cis nécessaires à la transcription, à la formation de la coiffe et à la polyadénylation du transgène, qui ont été copiés des éléments présents à la jonction N/P. 2 vecteurs différents permettent l'insertion entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) d'une part et H (hémagglutinine) et L (polymérase) d'autre part.

30 B. Les génomes recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol du virus de la rougeole ont été construits par l'insertion des ORFs de la protéine S et du polypeptide Ssol au sein d'une unité de transcription supplémentaire localisée entre les gènes P et M du vecteur.

35 Les différents gènes du virus de la rougeole (MV) sont indiqués : N (nucléoprotéine), PVC (phosphoprotéine et protéine V/C), M (matrice), F (fusion), H (hémagglutinine), L (polymérase). T7 = promoteur de l'ARN polymérase T7, hh = ribozyme hammerhead, T7t = séquence terminatrice de l'ARN polymérase du phage T7, ∂ = ribozyme du virus de l'hépatite ∂ , (2), (3) = unités de transcription supplémentaires (ATU).

Taille du génome du MV : 15894 nt.

SP : peptide signal

TM : région transmembranaire

40 FLAG : étiquette FLAG

- la figure 41 illustre l'expression de la protéine S par les virus rougeole recombinants, analysée par western blot.

45 Des extraits cytoplasmiques ont été préparés après infection de cellules Vero par différents passages des virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle. Des extraits cellulaires en tampon de dépôt selon Laemmli ont également été préparés 8 heures après infection de cellules VeroE6 par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3. Ils ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham).

50 Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

Pn : nième passage du virus après coculture de cellules 293-3-46 et Vero.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV

Mock : extrait contrôle de cellules VeroE6 non infectées

- 55 - la figure 42 montre l'expression de la protéine S par les virus rougeole recombinants, analysée par immunofluorescence

Des cellules Vero en monocouches sur lamelles de verre ont été infectées par le virus sauvage MWSchw (A) ou les virus MVSchw2-SARS-S (B) et MVSchw2-SARS-Ssol (C). Quand les syncytia ont atteint 30 à 40% de confluence

(A., B.) ou 90-100% (C), les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées par des anticorps polyclonaux de lapins anti-SRAS-CoV et un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé au FITC (Jackson).

- la figure 43 illustre l'analyse par western blot de l'immunoréactivité de sérums de lapins dirigés contre les peptides E1-12, E53-76 et M2-14. Le lapin 20047 a été immunisé avec le peptide E1-12 couplé à la KLH. Les lapins 22234 et 22240 ont été immunisés avec le peptide E53-76 couplé à la KLH. Les lapins 20013 et 20080 ont été immunisés avec le peptide M2-14 couplé à la KLH. Les immunosérums ont été analysés par western blot à l'aide d'extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV (B) ou à l'aide d'extraits de cellules infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine E (A) ou M (C) de l'isolat 031589 du SRAS-CoV. Les immunoempreintes ont été révélées à l'aide d'un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham).

[0148] La position des protéines E et M est indiquée par une flèche.

[0149] Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

[0150] Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Clonage et séquençage du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589

[0151] L'ARN de la souche de SARS-CoV a été extrait à partir du prélèvement de lavage bronchoalvéolaire répertorié sous le numéro 031589, effectué sur un patient de l'hôpital français de Hanoi (Vietnam) atteint de SRAS.

[0152] L'ARN isolé a été utilisé comme matrice pour amplifier les ADNc correspondant aux différents cadres ouverts de lecture du génome (ORF 1a, ORF 1b, ORF-S, ORF-E, ORF-M, ORF-N (incluant les ORF-13 et ORF-14), ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11), et aux extrémités 5' et 3' non-codantes. Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour l'amplification/détection ont été définies d'après la séquence nucléotidique disponible du SARS-CoV.

[0153] Dans ce qui suit les amorces et les sondes sont identifiées par : la lettre S, suivie d'une lettre qui indique la région correspondante du génome (L pour l'extrémité 5' incluant ORF1a et ORF1b ; S, M et N pour les ORF-S, ORF-M, ORF-N, SE et MN pour les régions intergénomiques correspondantes), puis éventuellement de Fn, Rn, avec n inclus entre 1 et 6 correspondant aux amorces utilisées pour la PCR nichée ou imbriquée (paire F1 + R1 pour la première amplification, paire F2 + R2 pour la deuxième amplification, etc...), puis de +/- ou -/- correspondant à une amorce sens ou antisens et enfin des positions des amorces en référence à la séquence Genbank AY27411.3 ; pour les amorces S et N sens et antisens et les autres amorces sens uniquement, lorsqu'une seule position est indiquée elle correspond à celle de l'extrémité 5' d'une sonde ou d'une amorce d'environ 20 bases ; pour les amorces antisens autres que les amorces S et N, lorsqu'une seule position est indiquée elle correspond à celle de l'extrémité 3' d'une sonde ou d'une amorce d'environ 20 bases.

[0154] Les produits d'amplifications ainsi générés ont été séquencés à l'aide d'amorces spécifiques afin de déterminer la séquence complète du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589. Ces produits d'amplification, à l'exception de ceux correspondant aux ORF1a et ORF1b, ont ensuite été clonés dans des vecteurs d'expression afin de produire les protéines virales correspondantes et les anticorps dirigés contre ces protéines, notamment par immunisation à base d'ADN.

1. Extraction des ARN

[0155] Les ARN ont été extraits à l'aide du kit *Qlamp viral RNA extraction mini* (QIAGEN) en suivant les recommandations du fabricant. De manière plus précise : 140 µl du prélèvement et 560 µl de tampon AVL ont été mélangés vigoureusement pendant 15 secondes, incubés 10 min à température ambiante puis centrifugés brièvement à vitesse maximale. 560 µl d'éthanol à 100% ont été ajoutés au surnageant et le mélange ainsi obtenu a été agité très vigoureusement pendant 15 sec. 630 µl du mélange ont ensuite été déposés sur la colonne.

[0156] La colonne a été placée sur un tube de 2 ml, centrifugée 1 min à 8000 rpm, puis le reste du mélange précédent a été déposé sur la même colonne, centrifugé à nouveau, 1 min à 8000 rpm et la colonne a été transférée sur un tube de 2 ml propre. Ensuite, 500 µl de tampon AW1 ont été ajoutés sur la colonne, puis la colonne a été centrifugée 1 min à 8000 rpm et l'éluat a été éliminé. 500 µl de tampon AW2 ont été ajoutés sur la colonne qui a ensuite été centrifugée 3 min à 14000 rpm et transférée sur un tube de 1,5 ml. Enfin, 60 µl de tampon AVE ont été ajoutés sur la colonne qui a été incubée 1 à 2 min à température ambiante puis centrifugée 1 min à 8000 rpm. L'éluat correspondant à l'ARN purifié a été récupéré et congelé à -20°C.

2. Amplification, séquençage et clonage des ADNc

2.1) ADNc codant pour la protéine S

5 [0157] Les ARN extraits à partir du prélèvement ont été soumis à une transcription inverse à l'aide d'oligonucléotides hexamériques de séquence aléatoire (pdN6), afin de produire des fragments d'ADNc.

[0158] La séquence codant pour la glycoprotéine S du SARS-CoV a été amplifiée sous la forme de deux fragments d'ADN chevauchants : fragment 5' (SRAS-Sa, SEQ ID NO:5) et fragment 3' (SRAS-Sb, SEQ ID NO:6), en réalisant deux amplifications successives à l'aide d'amorces imbriquées. Les amplicons ainsi obtenus ont été séquencés, clonés dans
10 le vecteur plasmidique PCR 2.1-TOPO™ (IN VITROGEN), puis la séquence des ADNc clonés a été déterminée.

a) clonage et séquençage des fragments Sa et Sb

a₁) synthèse de l'ADNc

15 [0159] Le mélange réactionnel contenant : ARN (5 µl) , H₂O ppi (3,5 µl), tampon de transcriptase inverse 5X (4 µl), dNTP 5 mM (2 µl), pdN6 100 ug/ml (4 µl), RNasin 40 UI/ul (0,5 µl) et transcriptase inverse AMV-RT, 10 UI/ul, PROMEGA (1µl) a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis l'ADNc obtenu a été maintenu à +4°C.

20

a₂) première amplification PCR

25 [0160] Les extrémités 5' et 3' du gène S ont été amplifiées respectivement avec les paires d'amorces S/F1/+ 21350-21372 et S/R1/-/ 23518-23498, S/F3/+ 23258-23277 et S/R3/-/25382-25363. Le mélange réactionnel de 50 µl contenant : ADNc (2 µl), amorces 50 µM (0,5 µl), tampon 10 X (5 µl), dNTP 5 mM (2 µl), Taq Expand High Fidelity, Roche (0,75 µl) et H₂O (39,75 µl) a été amplifié dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 2 min 30 sec, avec
30 10 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

30

a₃) deuxième amplification PCR

35 [0161] Les produits de la première amplification PCR (amplicons 5' et 3') ont subi une seconde étape d'amplification PCR (PCR nichée) dans des conditions identiques à celles de la première amplification, avec les paires d'amorces S/F2/+/21406-21426 et S/R2/-/23454-23435, et S/F4/+/23322-23341 et S/R4/-/25348-25329, respectivement pour l'amplicon 5' et l'amplicon 3'.

a₄) clonage et séquençage des fragments Sa et Sb

40 [0162] Les amplicons Sa (extrémité 5') et Sb (extrémité 3') ainsi obtenus ont été purifiés à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant, puis ils ont été clonés dans le vecteur PCR2.1-TOPO (kit Invitrogen), pour donner les plasmides dénommés SRAS-S1 et SRAS-S2.

[0163] L'ADN des clones Sa et Sb a été isolé puis l'insert correspondant a été séquencé à l'aide du Kit Big Dye, Applied Biosystem® et des amorces universelles M13 forward et M13 reverse, ainsi que des amorces : S/S/+/21867, S/S/+/22353, S/S/+/22811, S/S/+/23754, S/S/+/24207, S/S/+/24699, S/S/+/24348, S/S/-/24209, S/S/-/23630, S/S/-/23038, S/S/-/22454, S/S/-/21815, S/S/-/24784, S/S/+/21556, S/S/+/23130 et S/S/+/24465, en suivant les instructions du fabricant ; les séquences des fragments Sa et Sb ainsi obtenues correspondent aux séquences SEQ ID NO :5 et SEQ ID NO :6 dans la liste de séquences jointe en annexe.

45 [0164] Le plasmide, dénommé SARS-S1 a été déposé sous le n° I-3020, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 5' de la séquence du gène S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment dénommé Sa correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 23454 (SEQ ID NO :5), en référence à la séquence Genbank AY274119.3 Tor2.

50 [0165] Le plasmide, dénommé TOP10F'-SARS-S2 a été déposé sous le n° I-3019, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 3' de la séquence du gène S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment dénommé Sb correspondant aux nucléotides des positions 23322 à 25348 (SEQ ID NO :6), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

55

EP 1 694 829 B1

b) clonage et séquençage de l'ADNc complet (clone SRAS-S de 4 kb)

[0166] L'ADNc S complet a été obtenu à partir des clones SARS-S1 et SARS-S2 précités, de la façon suivante :

- 5 1) une réaction d'amplification PCR a été réalisée sur un clone SARS-S2 en présence de l'amorce S/R4/-/25348-25329 précitée et de l'amorce S/S/+/24696-24715: un amplicon de 633 pb a été obtenu,
2) une autre réaction d'amplification PCR a été réalisée sur un autre clone SARS-S2, en présence des amorces S/F4/+/23322-23341 précitée et S/S/- /24803-24784: un amplicon de 1481 pb a été obtenu,
10 La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception que 30 cycles d'amplifications comprenant une étape de dénaturation à 94° C pendant 20 sec et une étape d'élongation à 72° C pendant 2 min 30 sec ont été effectués.
3) les 2 amplicons (633 pb et 1481 pb) ont été purifiés dans les conditions telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb.
4) une autre réaction d'amplification PCR à l'aide des amorces S/F4/+/23322-23341 et S/R4/-/25348-25329 précitées, a été réalisée sur les amplicons purifiés obtenus en 3). La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception que 30 cycles d'amplifications ont été effectués.
15 L'amplicon de 2026 pb ainsi obtenu a été purifié, cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO puis séquencé comme ci-dessus, à l'aide des amorces telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. Le clone ainsi obtenu a été dénommé clone 3'.
20 5) Le clone SARS-S1 précédemment obtenu et le clone 3' ont été digérés par *EcoRI*, les bandes d'environ 2kb ainsi obtenues ont été purifiées sur gel puis amplifiées par PCR avec les amorces S/F2/+/21406-21426 et S/R4/-/25348-25329 précitées. La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception que 30 cycles d'amplifications ont été effectués. L'amplicon d'environ 4 kb a été purifié et séquencé. Il a ensuite été cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO pour donner le plasmide, dénommé SARS-S, et l'insert contenu dans ce plasmide a été séquencé comme ci-dessus, à l'aide des amorces telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. Les séquences d'ADNc de l'insert et de l'amplicon codant pour la protéine S, correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 2 dans la liste de séquences jointe en annexe, elles codent pour la protéine S (SEQ ID NO : 3).

25
30 **[0167]** La séquence de l'amplicon correspondant à l'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 présente les deux mutations suivantes par rapport aux séquences correspondantes de respectivement les isolats Tor2 et Urbani, les positions des mutations étant indiquées en référence à la séquence complète du génome de l'isolat Tor2 (Genbank AY274119.3) :

- 35
40 - g/t en position 23220 ; le codon alanine (gct) en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de Tor2 est remplacé par un codon sérine (tct),
- c/t en position 24872 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés de la protéine S, et

45 **[0168]** Le plasmide, dénommé SARS-S, a été déposé sous le n° I-3059, le 20 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 25348 (SEQ ID NO :4), en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

2.2) ADNc codant pour les protéines M et E

50 **[0169]** Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse, associée, lors de la même étape (kit *Titan One Step RT-PCR*®, Roche), à une réaction d'amplification par PCR, à l'aide des couples d'amorces :

- 55 - S/E/F1/+/26051-26070 et S/E/RI/-/26455-26436 pour amplifier l'ORF-E, et
- S/M/F1/+/26225-26244 et S/M/RI/-/27148-27129 pour amplifier l'ORF-M.

[0170] Un premier mélange réactionnel contenant : 8,6 µl d'H₂Oppi, 1 µl de dNTP (5mM), 0,2 µl de chacune des amorces (50µM), 1,25 µl de DTT (100mM) et 0,25 µl de RNAsin (40UI/µl) a été combiné avec un deuxième mélange réactionnel contenant : 1 µl d'ARN, 7 µl d'H₂Oppi, 5 µl de tampon de RT-PCR 5X et 0,5 µl de mélange d'enzyme et les mélanges combinés ont été incubés dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 30 min à 42°C, 10 min à

EP 1 694 829 B1

55°C, 2 min à 94°C suivi de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 68°C pendant 45 sec, avec 3 sec d'incrément par cycle et enfin une étape d'élongation terminale à 68°C pendant 7 min.

[0171] Les produits d'amplification ainsi obtenus (amplicons M et E) ont subi une deuxième amplification PCR (PCR nichée) en utilisant le kit Expand High-Fi®, Roche), à l'aide des couples d'amorces :

- S/E/F2+/26082-26101 et S/E/R2-/26413-26394 pour l'amplicon E, et
- S/M/F2+/26330-26350 et S/M/R2-/27098-27078 pour l'amplicon M.

[0172] Le mélange réactionnel contenant : 2 µl du produit de la première PCR, 39,25 µl d'H₂Oppi, 5 µl de tampon 10X contenant du MgCl₂, 2 µl de dNTP (5mM), 0,5µl de chacune des amorces (50 µM) et 0,75µl de mélange d'enzyme a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 72°C pendant 45 sec, avec 3 sec d'incrément par cycle, et enfin une étape d'élongation terminale à 72°C pendant 7 min. Les produits d'amplification obtenus correspondant aux ADNc codant pour les protéines E et M ont été séquencés comme ci-dessus, à l'aide des amorces : S/E/F2+/26082 et S/E/R2-/26394, S/M/F2+/26330, S/M/R2-/27078 précitées et des amorces S/M+/26636-26655 et S/M-/26567-26548. Ils ont ensuite été clonés, comme ci-dessus, pour donner les plasmides dénommés SARS-E et SARS-M. L'ADN de ces clones a ensuite été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 forward et M13 reverse ainsi que des amorces S/M+/26636 et S/M-/26548 précitées.

[0173] La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc codant pour la protéine E (SEQ ID NO : 13) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani. La séquence de la protéine E de la souche de SARS-CoV 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 14 dans la liste de séquences jointe en annexe.

[0174] Le plasmide, dénommé SARS-E a été déposé sous le n° I-3046, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26082 à 26413 (SEQ ID NO : 15), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

[0175] La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc codant pour la M (SEQ ID NO :16) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119.3-Tor2. En revanche, en position 26857, l'isolat AY278741-Urbani comporte un c et la séquence de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n°031589 un t. Cette mutation aboutit à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante: en position 154, une proline (AY278741-Urbani) est changée en sérine dans la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n°031589. La séquence de la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n°031589 correspond à la séquence SEQ ID NO :17 dans la liste de séquences jointe en annexe.

[0176] Le plasmide, dénommé SARS-M a été déposé sous le n° I-3047, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus ; laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26330 à 27098 (SEQ ID NO : 18), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

2.3) ADNc correspondant aux ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11

[0177] La même stratégie d'amplification, de clonage et de séquençage a été utilisée pour obtenir les fragments d'ADNc correspondant respectivement aux ORF suivantes: ORF 3, ORF4, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10 et ORF11. Les couples d'amorces utilisées pour la première amplification sont :

- ORF3 et ORF4 : S/SE/F1+/25069-25088 et S/SE/R1-/26300-26281
- ORF7 à ORF11 : S/MN/F1+/26898-26917 et S/MN/R1-/28287-28266

[0178] Les couples d'amorces utilisées pour la deuxième amplification sont :

- ORF3 et ORF4 : S/SE/F2+/25110-25129 et S/SE/R2-/26244-26225
- ORF7 à ORF11 : S/MN/F2+/26977-26996 et S/MN/R2-/28218-28199

[0179] Les conditions de la première amplification (RT-PCR) sont les suivantes : 45 min à 42°C, 10 min à 55°C, 2

EP 1 694 829 B1

min à 94°C suivi de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 68°C pendant 1 min, avec 5 sec d'incrément par cycle et enfin une étape d'élongation terminale à 68°C pendant 7 min.

Les conditions de la PCR nichée sont les suivantes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec, avec 4 sec d'incrément par cycle et enfin une étape d'élongation terminale à 72°C pendant 7 min.

[0180] Les produits d'amplification obtenus correspondant aux ADNc contenant respectivement les ORF3 et 4 et les ORF7 à 11 ont été séquencés à l'aide des amorces : S/SE+/25363, S/SE+/25835, S/SE-/25494, S/SE-/25875, S/MN+/27839, S/MN+/27409, S/MN-/27836 S/MN-/27799 et clonés comme ci-dessus pour les autres ORF, pour donner les plasmides dénommés SARS-SE et SARS-MN. L'ADN de ces clones a été isolé et séquencé à l'aide de ces mêmes amorces et des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens.

[0181] La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc de la région contenant les ORF 3 et 4 (SEQ ID NO :7) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 comporte une différence nucléotidique par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119-Tor2. Cette mutation en position 25298 aboutit à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante (ORF 3): en position 11, une arginine (AY274119-Tor2) est changée en glycine dans la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589. En revanche, aucune mutation n'a été identifiée par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY278741-Urbani. Les séquences des ORF 3 et 4 la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO :10 et 12 dans la liste de séquences jointe en annexe.

[0182] Le plasmide, dénommé SARS-SE a été déposé sous le n° I-3126, le 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle région correspondant aux nucléotides des positions 25110 à 26244 (SEQ ID NO :8), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

[0183] La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à la région contenant les ORF7 à ORF11 (SEQ ID NO :19) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119-Tor2 et AY278741-Urbani. Les séquences des ORF7 à 11 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 22, 24, 26, 28 et 30 dans la liste de séquences jointe en annexe.

[0184] Le plasmide dénommé SARS-MN a été déposé sous le n° I-3125, le 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevée à Hanoi, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26977 à 28218 (SEQ ID NO :20), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

[0185] La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à la région contenant les ORF7 à ORF11 (SEQ ID NO :19) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119-Tor2 et AY278741-Urbani. Les séquences des ORF7 à 11 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 22, 24, 26, 28 et 30 dans la liste de séquences jointe en annexe.

2.4) ADNc codant pour la protéine N et incluant les ORF13 et ORF14

[0186] L'ADNc a été synthétisé et amplifié comme décrit ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. De manière plus précise, le mélange réactionnel contenant : 5 µl d'ARN, 5 µl d'H₂O ppi 4 µl de tampon de reverse transcriptase 5X, 2 µl de dNTP (5 mM), 2 µl d'oligo 20T (5 µM), 0,5 µl de RNasin (40 UI/ul) et 1, 5 µl de AMV-RT (10 UI/ul Promega) a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis il a été maintenu à +4°C.

[0187] Une première amplification PCR a été réalisée avec la paire d'amorces S/N/F3+/28023 et S/N/R3-/29480.

[0188] Le mélange réactionnel comme ci-dessus pour l'amplification des fragments S1 et S2 a été incubé dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec avec 10 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

[0189] L'amplicon obtenu à la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification PCR (PCR nichée) avec la paires d'amorce S/N/F4+/28054 et S/N/R4-/29430 dans des conditions identiques à celles de la première amplification.

[0190] Le produit d'amplification obtenu correspondant à l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-

EP 1 694 829 B1

CoV issue du prélèvement n°031589a été séquencé à l'aide des amorces: S/N/F4/+/28054, S/N/R4/-/29430, S/N/+/28468, S/N/+/28918 et S/N/-/28607 et cloné comme ci-dessus pour les autres ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-N. L'ADN de ces clones a été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens, ainsi que des amorces S/N/+/28468, S/N/+/28918 et S/N/-/28607.

5 **[0191]** La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-N et incluant les ORF13 et ORF14 (SEQ ID NO :36) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani. La séquence de la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 37 dans la liste de séquences jointe en annexe.

10 **[0192]** Les séquences des ORF13 et 14 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 32 et 34 dans la liste de séquences jointe en annexe.

15 **[0193]** Le plasmide dénommé SARS-N a été déposé sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 28054 à 29430 (SEQ ID NO :38), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

2.5) extrémités 5' et 3' non-codantes

20 a) extrémité 5' non-codante (5'NC)

a₁) synthèse de l'ADNc

25 **[0194]** Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse dans les conditions suivantes :

[0195] L'ARN (15 µl) et l'amorce S/L-/443 (3 µl à la concentration de 5µm, ont été incubés 10 min à 75°C.

[0196] Ensuite, du Tampon de transcriptase inverse 5X (6 µl, INVITROGEN), des dNTP 10 mM (1 µl), du DTT 0,1M (3 µl) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 50°C pendant 3 min.

30 **[0197]** Enfin la transcriptase inverse (3 µl de Superscript®, INVITROGEN) a été ajoutée au mélange précédent qui a été incubé à 50°C pendant 1h30 puis à 90 °C pendant 2 min.

[0198] L'ADNc ainsi obtenu a été purifié à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant.

35 b₁) Réaction à la Terminal Transferase (TdT)

[0199] L'ADNc (10 µl) est incubé 2 min à 100°C, conservé dans la glace, puis sont ajoutés : H₂O (2,5 µl), tampon TdT 5X (4 µl, AMERSHAM), dATP 5mM (2 µl) et TdT (1,5 µl, AMERSHAM). Le mélange ainsi obtenu est incubé 45 min à 37°C puis 2 min à 65°C.

40 **[0200]** Le produit obtenu est amplifié par une première réaction PCR à l'aide des amorces : S/L-/225-206 et ancre 14T : 5'-AGATGAATTCGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO :68). Les conditions de l'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 10 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec puis de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

45 **[0201]** Le produit de la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification à l'aide des amorces : S/L-/204-185 et ancre 14T précitée dans des conditions identiques à celles de la première amplification. L'amplicon ainsi obtenu a été purifié, séquencé à l'aide de l'amorce S/L-/182-163 puis il a été cloné comme ci-dessus pour les différentes ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-5'NC. L'ADN de ce clone a été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens et de l'amorce S/L-/182-163 précitée.

50 **[0202]** L'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'extrémité 5'NC de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 72 dans la liste de séquences jointe en annexe ; cette séquence ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani.

55 **[0203]** Le plasmide dénommé SARS-5'NC a été déposé sous le n° I- 3124, le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc correspondant à l'extrémité 5' non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 1 à 204 (SEQ

EP 1 694 829 B1

ID NO :39), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

b) extrémité 3'non-codante (3'NC)

5 a.) synthèse de l'ADNc

[0204] Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse, selon le protocole suivant : le mélange réactionnel contenant : ARN (5 µl), H₂O (5 µl), tampon de transcriptase inverse 5X (4 µl), dNTP 5 mM (2 µl), Oligo 20T 5µM (2 µl), RNasin 40 U/ µl (0,5 µl) et RT-AMV 10 U/ µl (1,5 µl, PROMEGA) a été incubé dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis il a été maintenu à +4°C.

[0205] L'ADNc obtenu a été amplifié par une première réaction PCR à l'aide des amorces S/N/+28468-28487 et ancre 14T précitée. Les conditions de l'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 10 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec puis de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

[0206] Le produit de la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification à l'aide des amorces S/N/+28933-28952 et ancre 14T précitée, dans des conditions identiques à celles de la première amplification. L'amplicon ainsi obtenu a été purifié, séquencé à l'aide de l'amorce S/N/+29257-29278 et cloné comme ci-dessus pour les différentes ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-3'NC. L'ADN de ce clone a été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens et de l'amorce S/N/+29257-29278 précitée.

[0207] L'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'extrémité 3'NC de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO :73 dans la liste de séquences jointe en annexe ; cette séquence ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani.

[0208] Le plasmide dénommé SARS-3'NC a été déposé sous le n° I-3123 le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15. ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à l'extrémité 3'non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant à celle située entre le nucléotide en position 28933 à 29727 (SEQ ID NO :40), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3, se termine par une série de nucléotides a.

2.6) ORF1a et ORF1b

[0209] L'amplification de la région 5' contenant les ORF1a et ORF1b du génome du SARS-CoV issu du prélèvement 031589 a été réalisée en pratiquant des réactions de RT-PCR suivies de PCR nichées selon les mêmes principes que ceux précédemment décrits pour les autres ORF. Les fragments amplifiés sont chevauchants sur plusieurs dizaines de bases, permettant ainsi la reconstruction informatique de la séquence complète de cette partie du génome. En moyenne, les fragments amplifiés sont de deux kilobases.

[0210] 14 fragments chevauchants dénommés L0 à L12 ont ainsi été amplifiés à l'aide des amorces suivantes :

Tableau II: Amorces utilisées pour l'amplification de la région 5'(ORF1a et ORF1b)

REGION AMPLIFIEE ET SEQUENCEE (ne tient pas compte des amorces)	Amorce sens RT-PCR	Amorce antisens RT-PCR	Amorce sens PCR nichée	Amorce antisens PCR nichée
L0 50-480	S/L0/F1/+30	S/L0/R1/-481		
L1 231-2240	S/L1/F1/+147	S/L1/R1/-2336	S/L1/F2/+211	S/L1/R2/-2241
L2 2156-4167	S/L2/F1/+2033	S/L2/R1/-4192	S/L2/F2/+2136	S/L2/R2/-4168
L3 3913-5324	S/L3bis/F1/+3850	S/L3bis/R1/-5365	S/L3bis/F2/+3892	S/L3bis/R2/-5325
L4b 4952-6023	S/L4b/F1/+4878	S/L4b/R1/-6061	S/L4b/F2/+4932	S/L4b/R2/-6024
L4 5325-7318	S/L4/F1/+5272	S/L4/R1/-7392	S/L4/F2/+5305	S/L4/R2/-7323

EP 1 694 829 B1

(suite)

REGION AMPLIFIEE ET SEQUENCEE (ne tient pas compte des amorces)	Amorce sens RT- PCR	Amorce antisens RT-PCR	Amorce sens PCR nichée	Amorce antisens PCR nichée
L5 7296-9156	S/L5/F1/+7111	S/L5/R1/-9253	S/L5/F2/+7275	S/L5/R2/-9157
L6 9053-11066	S/L6/F1/+8975	S/L6/R1/-11151	S/L6/F2/+9032	S/L6/R2/-11067
L7 10928-12962	S/L7/F1/+10883	S/L7/R1/-13050	S/L7/F2/+10928	S/L7/R2/-12963
L8 12835-14834	S/L8/F1/+12690	S/L8/R1/-14857	S/L8/F2/+12815	S/L8/R2/-14835
L9 14765-16624	S/L9/F1/+14688	S/L9/R1/-16678	S/L9/F2/+14745	S/L9/R2/-16625
L10 16534-18570	S/L10/P1/+16451	S/L10/R1/-18594	S/L10/F2/+16514	S/L10/R2/-18571
L11 18521-20582	S/L11/F1/+18441	S/L11/R1/-20612	S/L11/F2/+18500	S/L11/R2/-20583
L12 20338-22205	S/L12/F1/+20279	S/L12/R1/-22229	S/L12/F2/+20319	S/L12/R2/-22206

[0211] Tous les fragments ont été amplifiés dans les conditions suivantes, excepté le fragment L0 qui a été amplifié comme décrit ci-dessus pour l'ORF-M :

- RT-PCR: 30 min à 42°C, 15 min à 55°C, 2 min à 94°C, puis l'ADNc obtenu est amplifié dans les conditions suivantes : 40 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 68°C pendant 1 min 30 sec, avec 5 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis une étape finale d'élongation à 68°C pendant 7 min.
- PCR nichée : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 3 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec, avec 5 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 min.

[0212] Les produits d'amplifications ont été séquencés à l'aide des amorces définies dans le Tableau III ci-après :

Tableau III : Amorces utilisées pour le séquençage de la région 5' (ORF1a et ORF1b)

Noms	Séquences (SEQ ID NO : 76 à 139)
S/L3/+4932	5'-CCACACACAGCTTGTGGATA-3'
S/L4/+6401	5'-CCGAAGTTGTAGGCAATGTC-3'
S/L4/+6964	5'-TTTGGTGCTCCTTCTTATTG-3'
S/L4/-6817	5'-CCGGCATCCAAACATAATTT-3'
S/L5/-7633	5'-TGGTCAGTAGGGTTGATTGG-3'
S/L5/-8127	5'-CATCCTTTGTGTCAACATCG-3'
S/L5/-8633	5'-GTCACGAGTGACACCATCCT-3'
S/L5/+7839	5'-ATGCGACGAGTCTGCTTCTA-3'
S/L5/+8785	5'-TTCATAGTGCTGGCTTACC-3'
S/L5/+8255	5'-ATCTTGGCGCATGTATTGAC-3'
S/L6/-9422	5'-TGCATTAGCAGCAACAACAT-3'
S/L6/-9966	5'-TCTGCAGAACAGCAGAAGTG-3'
S/L6/-10542	5'-CCTGTGCAGTTTGTCTGTCA-3'
S/L6/+10677	5'-CCTTGTGGCAATGAAGTACA-3'
S/L6/+10106	5'-ATGTCATTTGCACAGCAGAA-3'
S/L6/+9571	5'-CTTCAATGGTTTGCCATGTT-3'
S/L7/-11271	5'-TGCGAGCTGTCATGAGAATA-3'
S/L7/-11801	5'-AACCGAGAGCAGTACCACAG-3'

EP 1 694 829 B1

(suite)

Noms	Séquences (SEQ ID NO : 76 à 139)
S/L7/-/12383	5'-TTTGGCTGCTGTAGTCAATG-3'
S/L7+/12640	5'-CTACGACAGATGTCCTGTGC-3'
S/L7+/12088	5'-GAGCAGGCTGTAGCTAATGG-3'
S/L7+/11551	5'-TTAGGCTATTGTTGCTGCTG-3'
S/L8/-/13160	5'-CAGACAACATGAAGCACCAC-3'
S/L8/-/13704	5'-CGCTGACGTGATATATGTGG-3'
S/L8/-/14284	5'-TGCACAATGAAGGATACACC-3'
S/L8+/14453	5'-ACATAGCTCGCGTCTCAGTT-3'
S/L8+/13968	5'-GGCATTGTAGGCGTACTGAC-3'
S/L8+/13401	5'-GTTTGCGGTGTAAGTGCAG-3'
S/L9/-/15098	5'-TAGTGGCGGCTATTGACTTC-3'
S/L9/-/15677	5'-CTAAACCTTGAGCCGCATAG-3'
S/L9/-/16247	5'-CATGGTCATAGCAGCACTTG-3'
S/L9+/16323	5'-CCAGGTTGTGATGTCACTGAT-3'
S/L9+/15858	5'-CCTTACCCAGATCCATCAAG-3'
S/L9+/15288	5'-CGCAAACATAAACTTGCTG-3'
S/L10/-/16914	5'-AGTGTGGGTACAAGCCAGT-3'
S/L10/-/17466	5'-GTTCCAAGGAACATGTCTGG-3'
S/L10/-/18022	5'-AGGTGCCTGTGTAGGATGAA-3'
S/L10+/18245	5'-GGGCTGTCATGCAACTAGAG-3'
S/L10+/17663	5'-TCTTACACGCAATCCTGCTT-3'
S/L10+/17061	5'-TACCCATCTGCTCGCATAGT-3'
S/L11/-/18877	5'-GCAAGCAGAATTAACCCTCA-3'
S/L11/-/19396	5'-AGCACCACCTAAATTGCATC-3'
S/L11 /-/20002	5'-TGGTCCCTTTGAAGGTGTTA-3'
S/L11 /+/20245	5'-TCGAACACATCGTTTATGGA-3'
S/L11+/19611	5'-GAAGCACCTGTTTCCATCAT-3'
S/L11+/19021	5'-ACGATGCTCAGCCATGTAGT-3'
SARS/L1/F3/+800	5'-GAGGTGCAGTCACTCGCTAT-3'
SARS/L1/F4/+1391	5'-CAGAGATTGGACCTGAGCAT-3'
SARS/L1/F5/+1925	5'-CAGCAAACCACTCAATTCCT-3'
SARS/L1/R3/-/1674	5'-AAATGATGGCAACCTCTTCA-3'
SARS/L1/R4/-/1107	5'-CACGTGGTTGAATGACTTTG-3'
SARS/L1/R5/-/520	5'-ATTTCTGCAACCAGCTCAAC-3'
SARS/L2/F3/+2664	5'-CGCATTGTCTCCTGGTTTAC-3'
SARS/L2/F4/+3232	5'-GAGATTGAGCCAGAACCAGA-3'
SARS/L2/F5/+3746	5'-ATGAGCAGGTTGTCATGGAT-3'
SARS/L2/R3/-/3579	5'-CTGCCTTAAGAAGCTGGATG-3'
SARS/L2/R4/-/2991	5'-TTTCTTCACCAGCATCATCA-3'
SARS/L2/R5/-/2529	5'-CACCGTCTTGAGAACAACC-3'
SARS/L3/F3/+4708	5'-TCTTTGGCTGGCTCTTACAG-3'
SARS/L3/F4/+5305	5'-GCTGGTGATGCTGCTAACTT-3'
SARS/L3/F5/+5822	5'-CCATCAAGCCTGTGTCGTAT-3'
SARS/L3/R3/-/5610	5'-CAGGTGGTGCAGACATCATA-3'
SARS/L3/R4/-/4988	5'-AACATCAGCACCATCCAAGT-3'
SARS/L3/R5/-/4437	5'-ATCGGACACCATAGTCAACG-3'

[0213] Les séquences des fragments L0 à L12 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO :41 à SEQ ID NO :54 dans la liste de séquences jointe en annexe. Parmi ces séquences, seule celle correspondant aux fragments L5 comporte une différence nucléo-

tidique par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY278741-Urbani. Cette mutation t/c en position 7919 aboutit à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante, codée par l'ORF 1a: en position 2552, une valine (codon gtt ; AY278741) est changée en alanine (codon gct) dans la souche de SARS-CoV 031589. En revanche, aucune mutation n'a été identifiée par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119.3-Tor2. Les autres fragments ne présentent pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats Tor2 et Urbani.

Exemple 2 : Production et purification de protéines N et S recombinantes de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589

[0214] La protéine entière N et deux fragments polypeptidiques de la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589 ont été produites chez *E. coli*, sous forme de protéines de fusion comprenant une étiquette polyhistidine N-ou C-terminale. Dans les deux polypeptides S, les séquences hydrophobes N et C-terminales de la protéine S (peptide signal : positions 1 à 13 et hélice transmembranaire : positions 1196 à 1218) ont été délétées alors que l'hélice β (positions 565 à 687) et les deux motifs de type coiled-coils (positions 895 à 980 et 1155 à 1186) de la protéine S ont été préservés. Ces deux polypeptides sont constitués par : un fragment long (S_L) correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S et un fragment court (S_C) correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S. **1) Clonage des ADNc N, S_L et S_C dans les vecteurs d'expression pIVEX2.3 et**

pIVEX2.4

[0215] Les ADNc correspondant à la protéine N et aux fragments S_L et S_C ont été amplifiés par PCR dans des conditions standard, à l'aide de l'ADN polymérase Platinum Pfx® (INVITROGEN). Les plasmides SRAS-N et SRAS-S ont été utilisés comme matrice et les oligonucléotides suivants comme amorces :

5'-CCCATATGTCTGATAATGGACCCCAATCAAAC-3' (N sens, SEQ ID NO :55)
 5'-CCCCCGGGTGCCTGAGTTGAATCAGCAGAAGC-3' (N antisens, SEQ ID NO :56)
 5'-CCCATATGAGTGACCTTGACCGGTGCACCAC-3' (S_C sens, SEQ ID NO :57)
 5'-CCCATATGAAACCTTGACCCACCTGCTC-3' (S_L sens, SEQ ID NO :58)
 5'-CCCCCGGGTTTAATATATTGCTCATATTTTCCC-3' (S_C et S_L antisens, SEQ ID NO :59).

[0216] Les amorces sens introduisent un site *NdeI* (souligné) alors que les amorces antisens introduisent un site *XmaI* ou *SmaI* (souligné). Les 3 produits d'amplification ont été purifiés sur colonne (kit *QIAquick PCR Purification*, QIAGEN) et clonés dans un vecteur approprié. L'ADN plasmidique purifié des 3 constructions (kit *QIAfilter Midi Plasmid*, QIAGEN) a été vérifié par séquençage et digéré par les enzymes *NdeI* et *XmaI*. Les 3 fragments correspondants aux ADNc N, S_L et S_C ont été purifiés sur gel d'agarose puis insérés dans les plasmides pIVEX2.3MCS (étiquette polyhistidine C-terminale) et pIVEX2.4d (étiquette polyhistidine N-terminale) préalablement digérés par les mêmes enzymes. Après vérification des constructions, les 6 vecteurs d'expressions ainsi obtenus (pIV2.3N, pIV2.3 S_C , pIV2.3 S_L , pIV2.4N, pIV2.4 S_C également dénommé pIV2.4 S_I , pIV2.4 S_L) ont été ensuite utilisés, d'une part pour tester l'expression des protéines *in-vitro*, et d'autre part pour transformer la souche bactérienne BL21(DE3)pDIA17 (NOVAGEN). Ces constructions codent pour des protéines dont la masse moléculaire attendue est la suivante : pIV2.3N (47174 Da), pIV2.3 S_C (82897 Da), pIV2.3 S_L (132056 Da), pIV2.4N (48996 Da), pIV2.4 S_I (81076 Da) et pIV2.4 S_L (133877 Da). Des bactéries transformées par pIV2.3N ont été déposées à la CNCM le 23 octobre 2003, sous le numéro I-3117, et des bactéries transformées par pIV2.4 S_I ont été déposées à la CNCM le 23 octobre 2003, sous le numéro I-3118.

2) Analyse de l'expression des protéines recombinantes *in-vitro* et *in vivo*

[0217] L'expression de protéines recombinantes à partir des 6 vecteurs recombinants a été testée, dans un premier temps, dans un système *in-vitro* (RTS100, Roche). Les protéines produites *in vitro*, après une incubation des vecteurs recombinants pIVEX, 4h à 30°C, dans le système RTS100, ont été analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-(his)₆ couplé à la peroxydase. Le résultat d'expression *in-vitro* (Figure 1) montre que seule la protéine N est exprimée en quantités importantes, cela quelle que soit la position, N- ou C-terminale, de l'étiquette polyhistidine. Dans une seconde étape, l'expression des protéines N et S a été testée *in-vivo* à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). La protéine N est très bien produite dans ce système bactérien (Figure 2) et se retrouve principalement dans une fraction soluble après lyse des bactéries. En revanche, la version longue de S (S_L) est très peu produite et complètement insoluble (Figure 3). La version courte (S_C) présente également une très faible solubilité, mais un taux d'expression beaucoup plus élevé que celui de la version longue. Par ailleurs, la construction

S_C fusionnée à une étiquette polyhistidine en position C-terminale présente une taille plus faible que celle attendue. Une expérience d'immunodétection avec un anticorps anti-polyhistidine a montré que cette construction était incomplète. En conclusion, les deux constructions, pIV2.3N et pIV2.4S_I, exprimant respectivement la protéine N entière fusionnée à l'étiquette polyhistidine en C-terminal et la protéine S courte fusionnée à l'étiquette polyhistidine en N-terminal, ont été retenues pour produire les deux protéines en grande quantité afin de les purifier. Les plasmides pIV2.3N et pIV2.4S_I ont été déposés respectivement sous le n° I-3117 et I-3118 auprès de la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS 15, le 23 octobre 2003.

3) Analyse de l'activité antigénique des protéines recombinantes

[0218] L'activité antigénique des protéines N, S_L et S_C a été testée par western-blot, à l'aide de deux échantillons de sérum, provenant d'un même patient infecté par le SARS-CoV, prélevés 8 jours (M12) et 29 jours-(M13) après le début des symptômes du SRAS. Le protocole expérimental est comme décrit à l'exemple 3. Les résultats illustrés par la figure 4 montrent (i) la séroconversion du patient, et (ii) que la protéine N possède une plus forte réactivité antigénique que la protéine S courte.

4) Purification de la protéine N à partir de pIV2.3N

[0219] Plusieurs expériences de purification de la protéine N, produite à partir du vecteur pIV2.3N, ont été réalisées selon le protocole suivant. Les bactéries BL21(DE3)pDIA17, transformées par le vecteur d'expression pIV2.3N, ont été cultivées à 30°C dans 1 litre de milieu de culture contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline, et induites par 1 mM IPTG quand la densité cellulaire, équivalente à $A_{600} = 0,8$, est atteinte (environ 3 heures). Après 2 heures de culture en présence d'inducteur, les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min à 5000 rpm), remises en suspension dans le tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄, NaCl 0,3 M, 20 mM imidazole, pH 8 contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases Complete®, Roche), et lysées par la presse de French (12000 psi). Après centrifugation du lysat bactérien (15 min à 12000 rpm), le surnageant (50 ml) a été déposé à un débit de 1ml/min sur une colonne (15 ml) de chélation métallique (Ni-NTA superflow, Qiagen), équilibrée par le tampon de lyse. Après lavage de la colonne par 200 ml de tampon de lyse, la protéine N a été éluée par un gradient d'imidazole (20 → 250 mM) en 10 volumes de colonne. Les fractions contenant la protéine N ont été rassemblées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de Coomassie. Les résultats illustrés par la figure 5 montrent que le protocole employé permet de purifier la protéine N avec une homogénéité très satisfaisante (95%) et un rendement moyen de 15 mg de protéine par litre de culture.

5) Purification de la protéine S_C à partir de pIV2.4S_C (pIV2.4S_I)

[0220] Le protocole suivi pour purifier la protéine S courte est très différent de celui décrit ci-dessus car la protéine est fortement agrégée dans le système bactérien (corps d'inclusion). Les bactéries BL21(DE3)pDIA17, transformées par le vecteur d'expression pIV2.4S_I ont été cultivées à 30°C dans 1 litre de milieu de culture contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline, et induites par 1 mM IPTG quand la densité cellulaire, équivalente à $A_{600} = 0,8$, est atteinte (environ 3 heures). Après 2 heures de culture en présence d'inducteur, les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min à 5000 rpm), remises en suspension dans le tampon de lyse (0,1 M Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 7,5), et lysées par la presse de French (1200 psi). Après centrifugation du lysat bactérien (15 min à 12000 rpm), le culot a été remis en suspension dans 25 ml de tampon de lyse contenant 2% Triton X100 et 10 mM β-mercaptoéthanol, puis centrifugé pendant 20 min à 12000 rpm. Le culot a été remis en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM contenant 7 M urée, et mis en agitation douce pendant 30 min à température ambiante. Ce dernier lavage des corps d'inclusion avec 7 M urée est nécessaire pour éliminer la plupart des protéines membranaires d'*E. coli* qui co-sédimentent avec la protéine S_C agrégée. Après une dernière centrifugation pendant 20 min à 12000 rpm, le culot final est remis en suspension dans le tampon Tris-HCl 10 mM. L'analyse électrophorétique de cette préparation (Figure 6) montre que la protéine S courte peut être purifiée avec une homogénéité satisfaisante (environ 90%) à partir des corps d'inclusion (extrait insoluble).

Exemple 3 : Immunodominance de la protéine N

[0221] La réactivité des anticorps présents dans le sérum des patients atteints de pneumopathie atypique causée par le coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV), vis-à-vis des différentes protéines de ce virus, a été analysée par western-blot dans les conditions décrites ci-après.

1) Matériel

a) lysats de cellules infectées par le SARS-CoV

5 [0222] Des cellules Vero E6 (2×10^6) ont été infectées par le SARS-CoV (isolat répertorié sous le numéro FFM/MA104) à une multiplicité d'infection (M.O.I.) de 10^{-1} ou 10^{-2} puis incubées dans du milieu DMEM contenant 2% de SVF, à 35°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 . 48 heures plus tard, le tapis cellulaire a été lavé avec du PBS puis lysé avec 500 μl de tampon de dépôt préparé selon Laemmli et contenant du β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été bouillis 10 minutes puis soniqués 3 fois 20 secondes.

b) anticorps

b₁) sérum de patient atteint de pneumopathie atypique

15 [0223] Le sérum référencé au Centre National de Référence des virus influenzae (Région-Nord) sous le N° 20033168 est celui d'un patient français atteint d'une pneumopathie atypique causée par le SARS-CoV prélevé au jour 38 après le début des symptômes ; le diagnostic d'infection par le SARS-CoV a été réalisé par RT-PCR nichée et PCR quantitative.

b₂) sérums polyclonaux de lapin monospécifiques dirigés contre la protéine N ou la protéine S

20 [0224] Les sérums sont ceux produits à partir des protéines recombinantes N et S_C (exemple 2), selon le protocole d'immunisation décrit à l'exemple 4 ; il s'agit du sérum du lapin P13097 (sérum anti-N) et du sérum du lapin P11135 (sérum anti-S).

2) Méthode

25 [0225] 20 μl de lysat de cellules infectées par le SARS-CoV à des M.O.I. de 10^{-1} et 10^{-2} et, à titre de contrôle, 20 μl d'un lysat de cellules non infectées (mock) ont été séparés sur un gel SDS à 10% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage dans une solution de PBS/lait 5%/Tween 0,1% et lavage en PBS/Tween 0,1%, cette membrane a été hybridée pendant une nuit à 4°C avec : (i) l'immun-sérum N° 20033168 dilué au 1/300, 1/1000 et 1/3000 dans le tampon PBS/BSA 1%/Tween 0,1%, (ii) le sérum du lapin P13097 (sérum anti-N) dilué au 1/50000 dans le même tampon et (iii) le sérum du lapin P11135 (sérum anti-S) dilué au 1/10000 dans le même tampon. Après lavage en PBS/Tween, une hybridation secondaire a été réalisée à l'aide, soit d'anticorps polyclonaux de mouton dirigés contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines G humaines et couplés à la peroxidase (NA933V, Amersham), soit d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines G de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

3) Résultats

40 [0226] La figure 7 montre que trois polypeptides de masse moléculaire apparente 35, 55 et 200 kDa sont détectés spécifiquement dans les extraits de cellules infectées par le SARS-CoV.

45 [0227] Afin d'identifier ces polypeptides, deux autres immunoempreintes (figure 8) ont été réalisées sur les mêmes échantillons et dans les mêmes conditions avec des anticorps polyclonaux de lapins spécifique de la nucléoprotéine N (lapin P13097, figure 8A) et de la protéine de spicule S (lapin P11135, figure 8B) Cette expérience montre que le polypeptide de 200 kDa correspond à la glycoprotéine de spicule S du SARS-CoV, que le polypeptide de 55 kDa correspond à la nucléoprotéine N tandis que le polypeptide de 35 kDa représente vraisemblablement une forme tronquée ou dégradée de la N.

50 [0228] Les données présentées dans la figure 7 montrent donc que le sérum 20033168 réagit fortement avec la N et beaucoup plus faiblement avec la S du SARS-CoV, puisque les polypeptides de 35 et 55 kDa sont révélés sous la forme de bandes intenses pour des dilutions de 1/300, 1/1000 et 1/3000 de l'immunsérum alors que le polypeptide de 200 kDa n'est que faiblement révélé pour une dilution de 1/300. On peut noter également qu'aucun autre polypeptide du SARS-CoV n'est détecté pour des dilutions supérieures au 1/300 du sérum 20033168.

55 [0229] Cette expérience indique que la réponse en anticorps spécifique de la N du SARS-CoV domine les réponses en anticorps spécifiques des autres polypeptides du SARS-CoV et en particulier la réponse en anticorps dirigée contre la glycoprotéine S. Elle indique une immunodominance de la nucléoprotéine N lors des infections humaines par le SARS-CoV.

Exemple 4 : Réparation d'anticorps polyclonaux monospécifiques dirigés contre les protéines N et S du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV)**1) Matériel et méthode**

[0230] Trois lapins (P13097, P13081, P13031) ont été immunisés avec le polypeptide recombinant purifié correspondant à l'intégralité de la nucléoprotéine (N), préparé selon le protocole décrit à l'exemple 2. Après une première injection de 0,35 mg par lapin de protéine émulsionnée en adjuvant complet de Freund (voie intradermique), les animaux ont reçus 3 injections de rappel à 3 puis 4 semaines d'intervalle, de 0,35 mg de protéine recombinante émulsionnée en adjuvant incomplet de Freund.

[0231] Trois lapins (P11135, P13042, P14001) ont été immunisés avec le polypeptide recombinant correspondant au fragment court de la protéine S (S_C), produit comme décrit à l'exemple 2. Comme ce polypeptide est retrouvé principalement sous la forme de corps d'inclusion dans le cytoplasme bactérien, les animaux ont reçus 4 injections intra-dermiques à 3-4 semaines d'intervalle d'une préparation de corps d'inclusion correspondant à 0,5 mg de protéine recombinante émulsionnée en adjuvant incomplet de Freund. Les 3 premières injections ont été réalisées avec une préparation de corps d'inclusion préparés selon le protocole décrit à l'exemple 2, tandis que la quatrième injection a été réalisée avec une préparation de corps d'inclusion qui ont été préparés selon le protocole décrit à l'exemple 2 puis purifiés sur gradient de saccharose et lavés en 2 % Triton X100.

[0232] Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (p.i.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.) 5 semaines après la quatrième immunisation.

[0233] Dans un premier temps, la réactivité des sérums a été analysée par test ELISA vis à vis de préparations de protéines recombinantes semblables à celles utilisées pour les immunisations ; les tests ELISA ont été réalisés selon le protocole et avec les réactifs tels que décrits à l'exemple 6.

[0234] Dans un deuxième temps, la réactivité des sérums a été analysée en réalisant une immunoempreinte (western blot) d'un lysat de cellules infectées par le SARS-CoV, en suivant le protocole tel que décrit à l'exemple 3.

2) Résultats

[0235] Les tests ELISA (figure 9) démontrent que les préparations de protéine N recombinante et de corps d'inclusion du fragment court de la protéine S (S_C) sont immunogènes chez l'animal et que le titre des sérums immuns est élevé (plus de 1/25000).

[0236] L'immunoempreinte (figure 8) montre que le sérum immun du lapin P13097 reconnaît deux polypeptides présents dans les lysats de cellules infectées par le SARS-CoV : un polypeptide dont la masse moléculaire apparente (50-55 kDa selon les expériences) est compatible avec celle de la nucléoprotéine N (422 résidus, masse moléculaire prédite de 46 kDa) et un polypeptide de 35 kDa, qui représente vraisemblablement une forme tronquée ou dégradée de la N.

[0237] Cette expérience montre également que le sérum du lapin P11135 reconnaît principalement un polypeptide dont la masse moléculaire apparente (180-220 kDa selon les expériences) est compatible avec une forme glycosylée de la S (1255 résidus, chaîne polypeptidique non glycosylée de 139 kDa), ainsi que des polypeptides plus légers, qui représentent vraisemblablement des formes tronquées et/ou non glycosylées de la S.

[0238] En conclusion, l'ensemble de ces expériences démontrent que des polypeptides recombinants exprimés chez *E. coli* et correspondant aux protéines N et S du SARS-CoV permettent d'induire chez l'animal des anticorps polyclonaux capables de reconnaître les formes natives de ces protéines.

Exemple 5 : Préparation d'anticorps polyclonaux monospécifiques dirigés contre les protéines M et E du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV)**1) Analyse de la structure des protéines M et E****a) Protéine E**

[0239] La structure de la protéine E du SARS-CoV (76 acides aminés) a été analysée *in silico*, à l'aide de différents logiciels comme signalP v1.1, NetNGlyc 1.0, THMM 1.0 et 2.0 (Krogh et al., 2001, J. Mol. Biol., 305(3):567-580) ou encore TOPPRED (von Heijne, 1992, J. Mol. Biol. 225, 487-494). L'analyse montre que ce polypeptide non glycosylé est une protéine membranaire de type 1, contenant une seule hélice transmembranaire (aa 12-34 d'après THMM), et dont la plus grande partie du domaine hydrophile (42 résidus) est localisée à l'extrémité C-terminale et vraisemblablement à l'intérieur de la particule virale (endodomaine). On peut noter une inversion dans la topologie prédite par les versions 1.0 (N-ter est externe) et 2.0 (N-ter est interne) du logiciel THMM, mais que d'autres algorithmes, notamment TOPPRED

et THUMBUP (Zhou et Zhou, 2003, Protein Science 12 :1547-1555) confirment une localisation externe de l'extrémité N-terminale de E.

b) Protéine M

[0240] Une analyse similaire réalisée sur la protéine M du SARS-CoV (221 acides aminés) montre que ce polypeptide ne possède pas de peptide signal (d'après le logiciel signalP v1.1) mais trois domaines transmembranaires (résidus 15-37, 50-72, 77-99 d'après THMM2.0) et un grand domaine hydrophile (aa 100-221) localisé à l'intérieur de la particule virale (endodomaine). Elle est vraisemblablement glycosylée sur l'asparagine en position 4 (d'après NetNGlyc 1.0).

[0241] Ainsi, en accord avec les données expérimentales connues pour les autres coronavirus, il est remarquable que les deux protéines M et E présentent des endodomains correspondant à la majeure partie des polypeptides et des ectodomains de très petite taille.

- l'ectodomaine de E correspond vraisemblablement aux résidus 1 à 11 ou 1 à 12 de la protéine : MYSFVSEETGT (L), SEQ ID NO : 70. En effet, la probabilité associée à la localisation transmembranaire du résidu 12 est intermédiaire (0,56 d'après THMM 2.0).

- l'ectodomaine de M correspond vraisemblablement aux résidus 2 à 14 de la protéine : ADNGTITVEELKQ, SEQ ID NO : 69. En effet, la méthionine N-terminale de M est très probablement clivée du polypeptide mature car le résidu en position 2 est une Alanine (Varshavsky, 1996, 93:12142-12149).

[0242] Par ailleurs, l'analyse de l'hydrophobicité (Kyte & Doolittle, Hopp & Woods) de la protéine E met en évidence que l'extrémité C-terminale de l'endodomaine de E est hydrophile et donc vraisemblablement exposée à la surface de ce domaine. Ainsi, un peptide synthétique correspondant à cette extrémité est un bon candidat immunogène pour induire chez l'animal des anticorps dirigés contre l'endodomaine de E. En conséquence, un peptide correspondant aux 24 résidus C-terminaux de E a été synthétisé.

2) Préparation d'anticorps dirigés contre l'ectodomaine des protéines M et E et l'endodomaine de la protéine E

[0243] Les peptides M2-14 (ADNGTITVEELKQ, SEQ ID NO : 69), E1-12 (MYSFVSEETGTL, SEQ ID NO: 70) et E53-76 (KPTVYVYSRV KNLNSSEGVP DLLV, SEQ ID NO : 71) ont été synthétisés par Neosystem. Ils ont été couplés à la KLH (*Keyhole Limpet Heinocyanin*) à l'aide du MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) via une cystéine ajoutée au cours de la synthèse soit en N-terminal du peptide (cas de E53-76) soit en C-terminal (cas de M2-14 et E1-12).

[0244] Deux lapins ont été immunisés avec chacun des conjugués, en suivant le protocole d'immunisation suivant : après une première injection de 0,5 mg de peptide couplé à la KLH et émulsionné en adjuvant complet de Freund (voie intradermique), les animaux reçoivent 2 à 4 injections de rappel à 3 ou 4 semaines d'intervalle de 0,25 mg de peptide couplé à la KLH et émulsionné en adjuvant incomplet de Freund.

[0245] Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (p.i.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.) est préparé 3 à 5 semaines après les injections de rappel.

[0246] La réactivité des sérums a été analysée par western blot à l'aide d'extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV (figure 43B) ou à l'aide d'extraits de cellules infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine E (VV-TG-E, figure 43A) ou M (VV-TN-M, figure 43C) de l'isolat 031589 du SRAS-CoV.

[0247] Les immunosérums des lapins 22234 et 22240, immunisés par le conjugué KLH-E53-76, reconnaissent un polypeptide d'environ 9 à 10kD, qui est présent dans les extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV mais absent dans les extraits de cellules non infectées (figure 43B). La masse apparente de ce polypeptide est compatible avec la masse prédite de la protéine E, qui est de 8,4 kD. De façon similaire, l'immunosérum du lapin 20047, immunisé par le conjugué KLH-E1-12, reconnaît un polypeptide présent dans les extraits de cellules infectées par le virus VV-TG-E, dont la masse molaire apparente est compatible avec celle de la protéine E (figure 43A).

[0248] L'immunosérum des lapin 20013 et 20080, immunisés par le conjugué KLH-M2-14, reconnaît un polypeptide présent dans les extraits de cellules infectées par le virus VV-TN-M (figure 43C), dont la masse molaire apparente (18 kD environ) est compatible avec celle de la glycoprotéine M, qui est de 25,1 kD et présente un point isoélectrique élevé (9.1 pour le polypeptide nu).

[0249] Ces résultats démontrent que les peptides E1-12 et E53-76 d'une part et le peptide M2-14 d'autre part permettent d'induire chez l'animal des anticorps polyclonaux capables de reconnaître les formes natives des protéines E et M respectivement du SRAS-CoV.

Exemple 6 : Analyse de la réactivité en ELISA de la protéine N recombinante, vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS**1) Matériel**

[0250] L'antigène utilisé pour préparer les phases solides est la nucléoprotéine N recombinante purifiée préparée selon le protocole décrit à l'exemple 2.

[0251] Les sérums à tester (Tableau IV) ont été choisis sur la base des résultats d'analyse de leur réactivité par immunofluorescence (titre IF-SRAS), vis-à-vis de cellules infectées par le SARS-CoV.

Tableau IV: Sérums testés en ELISA

Référence	N° sérum	Type de sérum	Date du Sérum***	Titre IF-SRAS
3050	A	Témoin	na*	nt**
3048	B	Témoin	na	nt
033168	D	Patient 1- SRAS	27/04/03 (J38)	320
033397	E	Patient-1 SRAS	11/05/03 (J52)	320
032632	F	Patient-2 SRAS	21/03/03 (J17)	2500
032791	G	Patient-3 SRAS	04/04/03 (J3)	<40
033258	H	Patient-3 SRAS	28/04/03 (J27)	160

*na : non-applicable. ** nt : non-testé. *** les dates indiquées correspondent au nombre de jours après le début des symptômes de SRAS.

2) Méthode

[0252] La protéine N (100 µl) diluée à différentes concentrations dans du tampon carbonate 0,1 M, pH 9,6 (1, 2 ou 4 µg/ml) est distribuée dans les puits de plaques ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à température du laboratoire. Les plaques sont lavées avec du tampon PBS-Tween, saturées avec du tampon PBS-lait écrémé-saccharose (5 %). Les sérums à tester (100 µl) préalablement dilués (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 et 1/3200) sont ajoutés, puis les plaques sont incubées 1 h à 37° C. Après 3 lavages, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxydase (référence 209-035-098, JACKSON) dilué au 1/18000 est ajouté puis les plaques sont incubées 1h à 37 °C. Après 4 lavages, le chromogène (TMB) et le substrat (H₂O₂) sont ajoutés et les plaques sont incubées 30min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée puis l'absorbance à 450 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique.

3) Résultats

[0253] Les tests ELISA (figure 10) démontrent que la préparation de protéine N recombinante est reconnue spécifiquement par les anticorps de sérums de patients atteints de SRAS prélevés en phase tardive de l'infection (≥ 17 jours après le début des symptômes) alors qu'elle n'est pas reconnue de façon significative par les anticorps d'un sérum de patient prélevé en phase précoce de l'infection (3 jours après le début des symptômes) ni par des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS.

Exemple 7 : Tests ELISA élaborés pour une détection très spécifique et sensible d'une infection par le coronavirus associé au SRAS, à partir de sérums de patients**1) Test ELISA IgG indirect****a Réactifs***Préparation des plaques*

[0254] Les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à 2µg/mL dans un tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L. 100 µL de solution sont déposés dans les puits et laissés incubés à température ambiante

EP 1 694 829 B1

pendant une nuit. La saturation se fait par un prélavage en tampon PBS 10mM / tween 0,1%, suivi d'un lavage avec une solution de saturation PBS, 25% lait /saccharose.

Diluant serums

5

[0255] Tampon TRIS 0,48g/L, PBS 10mM, EDTA 3,7g/L, lait 15% v/v , pH 6,7

Diluant conjugué

10

[0256] Tampon citrate (15g/L), tween 0,5% , sérum bovin 25%, NaCl 12%, lait écrémé 6% v/v PH 6,5

Conjugué

15

[0257] Conjugué anti-IgG humaines 50X, commercialisés par Bio-Rad : kit Platelia H. pylori ref 72778

Autres solutions :

20

[0258] Solution de lavage R2, Solutions de révélation au TMB R8 diluant, R9 chromogène, R10 solution d'arrêt : réactifs commercialisés commercialisées par Bio-Rad (ex : kit *Platelia pylori*, ref 72778)

b) Mode opératoire

[0259]

25

Diluer les serums au **1/200** dans le diluant échantillons

Distribuer 100 μ L/puits

Incubation 1h à 37°C

3 lavages en solution de LAVAGE R2 10x préalablement diluée 10 fois en eau déminéralisée (*i.e.*, solution de lavage 1X)

30

Distribuer 100 μ L de conjugué (conjugué 50x à diluer extemporanément dans le diluant conjugué fourni)

Incubation 1h à 37°C

4 lavages en solution de lavage 1X

distribuer 200 μ L/puits de solution de révélation (à diluer extemporanément ex: mL de R9 dans 10mL de R8)

Incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité

35

arrêter la réaction avec 100 μ L/puits de R10

LECTURE à 450/620nm

40

[0260] Les résultats peuvent être interprétés en prenant un sérum SEUIL donnant une réponse au delà de laquelle les serums testés seront considérés comme positifs. Ce sérum est choisi et dilué de façon à donner un signal significativement supérieur au bruit de fond.

2) Test ELISA DOUBLE EPITOPE

a Réactifs

45

Préparation des plaques

50

[0261] Les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à 1 μ g/mL dans un tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L. 100 μ L de solution sont déposés dans les puits et laissés incubés à température ambiante pendant une nuit. La saturation se fait par un prélavage en tampon PBS 10mM / O,1% tween suivi d'un lavage avec une solution de saturation PBS 10mM, lait 25% (V/V)

Diluant serums et conjugué

55

[0262] Tampon TRIS saline 50mMpH8, lait 2%

Conjugué

5 [0263] Il s'agit de la protéine N recombinante purifiée, couplée à la peroxidase selon le protocole de Nakane (Nalcane P.K. and Kawaoi A; (1974) : Peroxydase-labeled antibody, a new method of conjugation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol22, N)23, pp 1084-1091.), dans des ratios molaires respectifs 1/2. Ce conjugué ProtN POD est utilisé à une concentration de 2µg/mL dans du diluant serum/conjugué.

Autres solutions :

10 [0264] Solution de lavage R2, Solutions de révélation au TMB R8, diluant, R9 chromogène, R10 solution d'arrêt : réactifs commercialisés par Bio-Rad (ex kit platelia pylori ref 72778).

b) Mode opératoire

15 *1ere étape en plaque de "prédilution"*

[0265]

- 20 ■ Diluer chaque sérum au 1/5 dans la plaque de prédilution (48 µL de diluant +12 µL de sérum).
- Après avoir dilués l'ensemble des serums, distribuer 60µL de conjugué
- Le cas échéant, le mélange sérum + conjugué est laissé à incuber.

2eme étape en plaque de "réaction"

25 [0266]

- 30 ■ Transférer 100µLde mélange/puits dans la plaque de réaction
- Incubation 1h 37°C
- 5 lavages en solution de LAVAGE R2 10x préalablement diluée 10 fois en eau déminéralisée (--> solution de lavage 1x)
- distribuer 200µL/puits de solution de révélation (à diluer extemporanément ex:1 mL de R9 dans 10mL de R8)
- incubation 30min à température ambiante à l'abri de la lumière
- arrêter la réaction avec 100µL/puits de R10
- 35 ■ LECTURE à 450/620nm

[0267] De même que pour le test ELISA indirect, les résultats peuvent être interprétés en utilisant un serum "valeur seuil". Tout serum ayant une réponse supérieure au sérum valeur seuil sera considéré comme positif.

40 **2) Résultats**

[0268] Les sérums de patients classés comme cas probables de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam ou en relation avec l'hôpital français de Hanoi (JYK) ont été analysés en utilisant le test IgG-N indirect et le test N double épitope.

45 [0269] Les résultats du test IgG-N indirect (figures 14 et 15) et N double épitope (figures 16 et 17) montrent une excellente corrélation entre eux ainsi qu'avec un test ELISA indirect comparant la réactivité des sérums vis-à-vis d'un lysat de cellules VeroE6 non infectées ou infectées par le SRAS-CoV (ELISA-lysate SRAS-CoV ; voir le Tableau V ci-après). Tous les sérums prélevés 12 jours ou plus après le début des symptômes ont été trouvés positifs, y compris chez des patients pour lesquels l'infection par le virus du SRAS-CoV n'avait pas pu être documentée par analyse de prélèvements respiratoires par RT-PCR, vraisemblablement en raison d'un prélèvement trop tardif au cours de l'infection (≥ J12). Dans le cas du patient TTH pour lequel un prélèvement nasal réalisé à J7 a été trouvé négatif par RT-PCR, la qualité du prélèvement pourrait être en cause.

50 [0270] Certains sérums ont été trouvés négatifs alors que la présence de SRAS-CoV a été détectée par RT-PCR. Il s'agit dans tous les cas de sérums précoces prélevés moins de 10 jours après le début des symptômes (ex : sérum # 032637). Dans le cas d'un patient PTTH (sérum # 032673), seule une suspicion de SRAS était évoquée au moment où les prélèvements ont été réalisés.

55 [0271] En conclusion, les tests sérologiques IgG-N indirect et N-double épitope permettent de documenter l'infection par le SRAS-CoV chez tous les patients pour des sérums prélevés 12 jours ou plus après l'infection.

Tableau V : Résultats des tests ELISA

Num Pvt	Patient	Jour	PCR-SARS (1)	ELISA lysat SRAS-CoV (2)	IgG-N (2 ^{ème} série)	2Xepitope (2 ^{ème} série)
033168	JYK	38	POS	+++	>5000	NT
033597	JYK	74	POS	NT	≈ 5000	NT
032552	VTT	8	NEG-J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032544	CTP	16	NEG J16&J20	++	>5000	>>20
032546	CJF	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032548	PTL	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032550	NTH	17	NEG-J17&J21	++	>5000	>>20
032553	VTT	8	NEG-J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032554	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032555	NTBV	4	POS	NEG	<200	
032564	NTP	15	POS	++	>5000	>>20
032629	NVH	4	POS	NEG	<200	<5
032631	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5
032635	NHH	4	POS	NEG	<200	<5
032637	NHB	10	POS	NEG	<200	<5
032642	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5
032643	LTDH	1	POS	NEG	<200	<5
032644	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032646	TTH	12	NEG J7&J12&J16	++	>5000	>>20
032647	DTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032648	NNT	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032649	PTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032672	LVV	16	NEG J16&J20	+	>5000	>>20
032673	PTTH	NA	NEG	NEG	<200	<5
032674	PNB	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032682	VTH	12	NEG J12&J16	++	>5000	>>20
032683	DTV	17	NEG J17&J21	+	>1000	>>20
Notes:						
(1) : Les analyses par RT-PCR ont été réalisées par RT-PCR nichée BNI, LC Artus et LC-N sur des écouvillonnages nasaux ou pharyngés; POS signifie qu'au moins un prélèvement a été trouvé positif chez ce patient.						
(2) : La réactivité des sérums dans le test ELISA utilisant un lysat de cellules infectées par le SRAS-CoV a été classée en très fortement réactif (+++), fortement réactif (++) , réactif (+) et négatif en fonction de la valeur DO obtenue aux dilutions testées						

Exemple 8 : Détection du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV) par RT-PCR

1) Mise au point de conditions de RT-PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques du gène de la protéine de nucléocapside - test "Light Cycler N"

5

a) conception des amorces et des sondes

[0272] La conception des amorces et sondes a été réalisée à partir de la séquence du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589, à l'aide du programme "Light Cycler Probe Design (Roche)". Ainsi les deux séries d'amorces et de sondes suivantes ont été sélectionnées :

10

- série 1 (SEQ ID NO : 60, 61, 64, 65):

[0273]

15

- amorce sens : N+/28507 : 5'-GGC ATC GTA TGG GTT G-3' [28507-28522]
- amorce antisens : N-/28774 : 5'-CAG TTT CAC CAC CTC C-3' [28774-28759]
- sonde 1 : 5'-GGC ACC CGC AAT CCT AAT AAC AAT GC-fluorescéine 3' [28561-28586]
- sonde 2 : 5' Red705 -GCC ACC GTG CTA CAA CTT CCT-phosphate [28588-28608]

20

- série 2 (SEQ ID NO : 62, 63, 66, 67)

[0274]

25

- amorce sens : N+/28375 : 5'-GGC TAC TAC CGA AGA G-3' [28375-28390]
- amorce antisens : N-/28702 : 5'-AAT TAC CGC GAC TAC G-3' [28702-28687]
- sonde 1 : SRAS/N/FL : 5'-ATA CAC CCA AAG ACC ACA TTG GC - fluorescéine 3' [28541-28563]
- sonde 2 : SRAS/N/LC705 : 5' Red705 -CCC GCA ATC CTA ATA ACA ATG CTG C-phosphate 3' [28565-28589]

30

b) analyse de l'efficacité des deux couples amorces

[0275] Afin de tester l'efficacité respective des deux couples d'amorces, une amplification par RT-PCR a été réalisée sur un ARN synthétique correspondant aux nucléotides 28054-29430 du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589 et contenant la séquence du gène N.

35

[0276] De manière plus précise :

Cet ARN synthétique a été préparé par transcription *in vitro* à l'aide de l'ARN polymérase du phage T7, d'une matrice d'ADN obtenu par linéarisation du plasmide SRAS-N avec l'enzyme *Bam H1*. Après élimination de la matrice d'ADN par digestion à l'aide de DNase 1, les ARN synthétiques sont purifiés par une extraction au phénol-chloroforme suivie de deux précipitations successives en acétate d'ammonium et isopropanol. Ils sont alors quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm et leur qualité est contrôlée par le rapport des absorbances à 260 et 280 nm ainsi que par une électrophorèse en gel d'agarose. Ainsi, la concentration de la préparation d'ARN synthétique utilisée pour ces études est de 1,6 mg/ml, ce qui correspond à $2,1 \cdot 10^{15}$ copies/ml d'ARN.

40

[0277] Des quantités décroissantes d'ARN synthétique ont été amplifiées par RT-PCR à l'aide du kit "Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq" et les couples d'amorces n° 1 (N+/28507, N-/28774) (figure 1A) et n° 2 (N+/28375, N-/28702) (figure 1B), en suivant les indications du fournisseur. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes : l'ADNc a été synthétisé par incubation 30 min à 45 °C, 15 min à 55°C puis 2 min à 94 °C puis il a été amplifié par 5 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, suivis de 35 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, avec 2 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, et d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min. Les produits d'amplification obtenus ont ensuite été maintenus à 10°C.

45

50

[0278] Les résultats présentés à la figure 11 montrent que le couple d'amorces n° 2 (N+/28375, N-/28702) permet de détecter jusqu'à 10 copies d'ARN (bande de faible intensité) ou 10^2 copies (bande de bonne intensité) contre 10^4 copies pour le couple d'amorces n° 1 (N+/28507, N-/28774). Les amplicons sont respectivement de 268 pb (couple 1) et de 328 pb (couple 2).

55

c) mise au point de la RT-PCR en temps réel

[0279] Une RT-PCR en temps réel a été mise au point à l'aide du couple d'amorces n°2 et du couple de sonde constitué par SRAS/N/FL et SRAS/N/LC705 (figure 2).

5 **[0280]** L'amplification a été réalisée sur un LightCycler™ (Roche) à l'aide du kit "Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes" (référence 2 015 145, Roche) dans les conditions optimisées suivantes. Un Mélange réactionnel contenant : H₂O (6,8 µl), MgCl₂ 25 mM (0,8 µl, 4 µM final de Mg²⁺), mélange réactionnel 5X (4 µl), sonde SRAS/N/FL 3 µM (0,5 µl, 0,075 µM final), sonde SRAS/N/LC705 3 µM (0,5 µl, 0,075 µM final), amorce N+/28375 10 µM (1 µl, 0,5 µM final), amorce N-/28702 10 µM (1 µl, 0,5 µM final), mélange d'enzyme (0,4 µl) et échantillon (ARN viral, 5 µl) a été amplifié en suivant le programme suivant :

- Transcription inverse : 50°C 10:00min analysis mode: none
- Dénaturation : 95°C 30sec x1 analysis mode: none
- Amplification : 95°C 2sec }
- 15 **50°C** . 15sec analysis mode: quantification* } x45
- 72°C 13sec rampe thermique 2,0°C/sec }
- refroidissement : 40°C 30sec x1 analysis mode: none

*La mesure de fluorescence se fait à la fin de l'hybridation et à chaque cycle (en mode SINGLE).

20 **[0281]** Les résultats présentés à la figure 12 montrent que cette RT-PCR en temps réel est très sensible puisqu'elle permet de détecter 10² copies d'ARN synthétique dans 100% des 5 échantillons analysés (29/29 échantillons dans 8 expériences) et jusqu'à 10 copies d'ARN dans 100% des 5 échantillons analysés (40/45 échantillons dans 8 expériences). Elle montre également que cette RT-PCR permet de détecter la présence du génome du SARS-CoV dans un échantillon et de quantifier le nombre de génomes présents. A titre d'exemple, l'ARN viral d'un stock de SARS-CoV cultivé sur

25 cellules Vero E6 a été extrait à l'aide du kit "Qiamp viral RNA extraction" (Qiagen), dilué à 0,05.10⁻⁴ et analysé par RT-PCR en temps réel selon le protocole décrit ci-dessus; l'analyse présentée à la figure 12 montre que ce stock de virus contient 6,5.10⁹ génomes -équivalents/ml (geq/ml), ce qui est tout à fait similaire à la valeur de 1,0.10¹⁰ geq/ml mesurée à l'aide du kit "RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents" commercialisé par Artus.

30 **2) Mise au point de conditions de RT-PCR nichée ciblant le gène de l'ARN polymérase - test "RT-PCR nichée CDC (Centers for Disease Control and Prevention) /IP"**

a) Extraction de l'ARN viral

35 **[0282]** Echantillon clinique : QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) selon les indications du fabricant, ou une technique équivalente. L'ARN est élué dans un volume de 60 µl.

b) RT-PCR nichée "SNE/SAR"

40 *Première étape : RT-PCR couplée « SNE »*

[0283] Le kit Invitrogen "Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq" a été utilisé, mais le kit "Titan" de Roche Boehringer peut lui être substitué avec des résultats similaires.

45 Oligonucléotides :

[0284]

- SNE-S1 5' GGT TGG GAT TAT CCA AAA TGT GA 3'
- 50 - SNE-AS1 5'GCA TCA TCA GAA AGA ATC ATC ATG 3'

-> Taille attendue :**440 pb**

1. Préparer un mix :

55	H2O	6,5 µl
	Reaction mix 2X	12,5 µl
	Oligo SNE-S1 50 µM	0,2 µl

EP 1 694 829 B1

(suite)

5		Oligo SNE-AS1 50 μ M	0,2 μ l
		RNAsin 40 U/ μ l	0,12 μ l
		RT/Platinum Taq mix	0,5 μ l

2. A 20 μ l du mix, ajouter 5 μ l d'ARN et procéder à l'amplification sur thermocycleur (conditions ABI 9600) :

10	2.1	45°C	30 min.	
		55°C	15 min.	
		94°C	2 min.	
	2.2.	94°C	15 sec.	}
		45°C	30 sec.	} x 5 cycles
15		72°C	30 sec.	}
	2.3.	94°C	15 sec.	}
		55°C	30 sec.	} x 35 cycles
		72°C	30 sec. + 2sec./cycle	}
20	2.4.	72°C	5 min.	
	2.5	10°C	∞	

Conservation à +4°C.

[0285] La RNAsin (N2511/N2515) de Promega a été utilisée comme inhibiteurs de RNase.

25 [0286] Des ARN synthétiques ont servi de témoin positif. A titre de contrôle, 10^3 , 10^2 et 10 copies d'ARN synthétique R_{SNE} ont été amplifiées dans chaque expérience.

Seconde étape : PCR nichée "SAR"

30 Oligonucléotides :

[0287]

- 35 - SAR1-S 5' CCT CTC TTG TTC TTG CTC GCA 3'
- SAR1-AS 5' TAT AGT GAG CCG CCA CAC ATG 3'

-> Taille attendue : **121 pb**

1. Préparer un mix :

40		H2O	35,8 μ l
		Tampon Taq 10X	5 μ l
		MgCl ₂ 25 mM	4 μ l
		Mix dNTPs 5 mM	2 μ l
45		Oligo SAR1-S 50 μ M	0,5 μ l
		Oligo SAR1-AS 50 μ M	0,5 μ l
		Taq ADN pol 5 U/ μ l	0,25 μ l

L'AmpliTaq DNA Pol d'Applied Biosystems a été utilisée (tampon 10X sans MgCl₂, réf 27216601).

50 2. A 48 μ l du mix, ajouter 2 μ l du produit de la première PCR et procéder à l'amplification (conditions ABI 9600) :

55	2.1.	94°C	2 min.	
	2.2.	94°C	30 sec.	}
		45°C	45 sec.	} x 5 cycles
		72°C	30 sec.	}
	2.3.	94°C	30 sec.	}
		55°C	30 sec.	} x 35 cycles

EP 1 694 829 B1

(suite)

	72°C	30 sec. + 1sec./cycle	}
2.4.	72°C	5 min.	
2.5	10°C	∞	

3. Analyser 10 µl du produit réactionnel sur gel "*low-melting*" (type Seakem GTG) à 3% d'agarose.

La sensibilité du test niché est en routine, dans les conditions décrites, de 10 copies d'ARN.

4. Les fragments peuvent ensuite être purifiés sur QIAquick PCR kilt (QIAGEN) et séquencés avec les oligos SAR1-S et SAR1-AS.

3) Détection de l'ARN du SARS-CoV par PCR à partir de prélèvements respiratoires

a) Première étude comparative

[0288] Une étude comparative a été réalisée sur une série de prélèvements respiratoires reçus par le Centre National de Référence du Virus Influenzae (région nord) et susceptibles de contenir du SARS-CoV. Pour ce faire, l'ARN a été extrait des prélèvements à l'aide du kit "Qiampr viral RNA extraction" (Qiagen) et analysé par RT-PCR en temps réel, d'une part à l'aide des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2 dans les conditions décrites ci-dessus d'une part, et d'autre part à l'aide du kit "LightCycler SARS-CoV quantification kit" commercialisé par Roche (référence 03 604 438). Les résultats sont résumés dans le Tableau VI ci-dessous. Ils montrent que 18 des 26 prélèvements sont négatifs et 5 des 26 prélèvements sont positifs pour les deux kits, tandis qu'un prélèvement est positif pour le seul kit Roche et deux pour les seuls réactifs N "série2". En outre, pour 3 prélèvements (20032701, 20032712, 20032714) les quantités d'ARN détectés sont nettement supérieures avec les réactifs (sondes et amorces) de la série n°2. Ces résultats indiquent que les amorces et sondes N "série2" sont plus sensibles pour la détection du génome du SARS-CoV dans des prélèvements biologiques que celles du kit actuellement disponible.

Tableau VI: Analyse par RT-PCR en temps réel des ARN extraits d'une série de prélèvements de 5 patients à l'aide des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2 (N "série 2") ou du kit "LightCycler SARS-CoV quantification kit" (Roche). Le type de prélèvement est indiqué ainsi que le nombre de copies de génome viral mesurées dans chacun des deux tests. NEG : RT-PCR négative.

Prélèvements n°	Patient	Type de prélèvement	KIT ROCHE	N "série2"
20033082	K	nasal	NEG	NEG
20033083	K	pharyngé	NEG	NEG
20033086	K	nasal	NEG	NEG
20033087	K	pharyngé	NEG	NEG
20032802	M	nasal	NEG	NEG
20032803	M	expectoration	NEG	NEG
20032806	M	nasal ou pharyngé	NEG	NEG
20031746ARN2	C	pharyngé	NEG	NEG
20032711	C	nasal ou pharyngé	39	NEG
20032910	B	nasal	NEG	NEG
20032911	B	pharyngé	NEG	NEG
20033356	V	expectoration	NEG	NEG
20033357	V	expectoration	NEG	NEG
20031725	K	asp. endotrachéale	NEG	150
20032657	K	asp. endotrachéale	NEG	NEG
20032698	K	asp. endotrachéale	NEG	NEG
20032720	K	asp. endotrachéale	3	5
20033074	K	selles	115	257
20032701	M	pharyngé	443	1676
20032702	M	expectoration	NEG	249
20031747ARN2	C	pharyngé	NEG	NEG

EP 1 694 829 B1

(suite)

Prélèvements n°	Patient	Type de prélèvement	KIT ROCHE	N "série2"
20032712	C	inconnu	634	6914
20032714	C	pharyngé	17	223
20032800	B	nasal	NEG	NEG
20033353	V	nasal	NEG	NEG
20033384	V	nasal	NEG	NEG

b) Deuxième étude comparative

[0289] Les performances de différentes méthodes de RT-PCR nichée et de RT-PCR en temps réel ont ensuite été comparées pour 121 prélèvements respiratoires de cas possibles de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam, réalisés entre le 4^{ème} et le 17^{ème} jour après le début des symptômes. Parmi ces prélèvements, 14 avaient été trouvés positifs lors d'un premier test utilisant la méthode de RT-PCR nichée ciblant l'ORF1b (codant pour la réplicase) telle que décrite initialement par le Bernhard Nocht Institute (RT-PCR nichée BNI). Des informations concernant ce test sont disponibles sur internet, à l'adresse http://www15.bni-hamburg.de/bnilbn12/neu2/getfile.acgi?area_engl=diagnostics&pid=4112.

[0290] Les différents tests comparés dans cette étude sont :

- la méthode de RT-PCR quantitative selon l'invention, avec les amorces et sonde N "série 2" décrite ci-dessus (colonne Light Cycler N),
- le test de RT-PCR nichée ciblant le gène de l'ARN polymérase décrit ci-dessus, développé par le CDC, le BNI et l'Institut Pasteur (RT-PCR nichée CDC/IP),
- le kit ARTUS de référence "HPA Corona LC RT-PCR Kit # 5601-02", qui est un test de RT-PCR en temps réel ciblant le gène ORF1b,
- le test de RT-PCR nichée du BNI, ciblant également le gène de l'ARN polymérase, mentionné ci-dessus.

[0291] Les inventeurs ont constaté :

- 1) une variabilité inter-test pour une même technique, liée à la dégradation de la préparation d'ARN lors de décongélation répétées, notamment pour les échantillons contenant les quantités d'ARN les plus faibles,
- 2) une sensibilité réduite de la RT-PCR nichée CDC/IP par rapport à la RT-PCR nichée BNI, et
- 3) une sensibilité comparable du test de RT-PCR quantitative selon l'invention (Light Cycler N) par rapport au test Light Cycler (LC) Artus.

[0292] Ces résultats, présentés dans le Tableau VII ci-dessous, montrent que le test par RT-PCR quantitative selon l'invention constitue un excellent complément - ou une alternative - aux tests actuellement disponibles. En effet, le coronavirus lié au SRAS est un virus émergent, susceptible d'évoluer rapidement. En particulier, le gène de la RNA polymérase du coronavirus lié au SRAS, qui est ciblé dans la plupart des tests actuellement disponibles, peut recombiner avec celui d'autres coronavirus non liés au SRAS. L'utilisation d'un test ciblant exclusivement ce gène pourrait alors conduire à l'obtention de faux négatifs.

[0293] Le test par RT-PCR quantitative selon l'invention ne cible pas la même région génomique que le kit ARTUS, puisqu'il cible le gène codant pour la protéine N. En réalisant un test de diagnostique ciblant deux gènes différents du coronavirus lié au SRAS, on peut donc espérer s'affranchir de résultats de type faux négatifs, qui pourraient être dus à l'évolution génétique du virus.

[0294] De plus, il apparaît particulièrement avantageux de cibler le gène de la protéine de nucléocapside, car il est très stable, du fait de la forte pression de sélection liée aux contraintes structurales élevées concernant cette protéine.

Tableau VII: Comparaison de différentes méthodes d'analyse par amplification génique, à partir de 121 Prélèvements de cas probables de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam (épidémie 2003)

N° CNR	Type prélèvement (1)	Jour prélèvement	Patient	RT-PCR nichée CDC/IP	RT-PCR nichée BNI	kit Light Cycler Artus	Light Cycler N (IP)
107 prélèvements	N et P			Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
032529	P	10	NHB	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
032530	N	10	NHB	Positif	Positif	3,10E+01	4,20E+01
032531	P	7	LP	Positif	Positif	7,70E+00	3,10E+00
032534	N	15	BND	Positif	Positif	1,60E+00	Négatif
032600	P	4	NHH	Négatif	Positif	Négatif	1,30E+02
032612	P	17	NTS	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
032688	P	9	BTX	Positif	Positif	Négatif	Négatif
032689	N	4	NVH	Positif	Positif	1,20E+01	2,30E+02
032690	P	4	NVH	Négatif	Positif	1,60E+00	Négatif
032727	P	8	NVH	Positif	Positif	2,30E+02	4,00E+02
032728	N	8	NVH	Positif	Positif	1,10E+03	1,60E+04
032729	P	14	NHB	Positif	Positif	5,90E+00	3,40E+01
032730	N	14	NHB	Positif	Positif	1,30E+02	4,80E+02
032741	P	8	NHH	Positif	Positif	2,10E+02	1,30E+02
positifs				10	14	10	9
fraction détectée des 14 positifs				71,4%	100,0%	71,4%	64,3%
(1) P= écouvillonnage pharyngé N= écouvillonnage nasal							

Exemple 9 : Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine N

[0295] Des souris Balb C ont été immunisées à l'aide de la protéine N recombinante purifiée et leurs cellules spléniques fusionnées avec un myélome murin approprié selon les techniques de Köhler et Milstein.

[0296] Dix-neuf hybridomes sécréteurs d'anticorps anti N ont été présélectionnés et leurs immuno réactivités précisées. Ces anticorps reconnaissent bien la protéine N recombinante (en ELISA) avec des intensités variables, ainsi que la protéine virale, naturelle N en ELISA et/ou en Western Blot. Les figures 18 à 20 montrent les résultats de ces tests pour 15 de ces 19 anticorps monoclonaux.

[0297] Les clones 12, 17, 28, 57, 72, 76, 86, 87, 98, 103, 146, 156, 166, 170, 199, 212, 218, 219 et 222, fortement réactifs, ont été sous clonés. Les études de spécificité ont été poursuivies avec les outils appropriés afin de préciser les épitopes reconnus et vérifier l'absence de réactivité vis-à-vis des autres Coronavirus humains et de certains virus respiratoires.

[0298] Les études de cartographie (*mapping*) épitopique (réalisées sur membrane spot, à l'aide de peptides chevauchants de 15 aa) et les études supplémentaires réalisées sur la protéine N naturelle en Western Blot ont révélé l'existence de 4 groupes d'anticorps monoclonaux :

1° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur en position N-ter (75-81, séquence : INTNSVP)
Le représentant de ce groupe est l'anticorps 156. L'hybridome produisant cet anticorps a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur (Paris, France) le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro I-3331. Ce même épitope est également reconnu par un sérum de lapin (polyclonal anti N) obtenu par immunisation classique à l'aide de cette même protéine N.

EP 1 694 829 B1

2° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur situé en position centrale (position 217-224, séquence : ETALALL); les représentants de ce groupe sont les anticorps monoclonaux 87 et 166. L'hybridome produisant l'anticorps 87 a été déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro I-3328.

3° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur situé en position C-terminale (position 403-408, séquence : DFFRQL), les représentants de ce groupe sont les anticorps 28, 57 et 143. L'hybridome produisant l'anticorps 57 a été déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro I-3330.

4° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope discontinu, conformationnel. Ce groupe d'anticorps ne reconnaît aucun des peptides recouvrant la séquence de la protéine N, mais réagissent fortement sur la protéine naturelle non dénaturée. Le représentant de ce dernier groupe est l'anticorps 86. L'hybridome produisant cet anticorps a été déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro I-3329.

[0299] Le Tableau VIII ci-après résume les résultats de cartographie épitopique obtenus :

Tableau VIII : Mapping épitopique des anticorps monoclonaux

Anticorps	Epitope	Position	Région
28	DFSRQL Q	403 ... 408	C-Ter.
143	DFSRQL Q		
76	DFSRQL Q		
57	DFSRQL Q		
	<i>FFGMS RI</i>	315 319	
146	LPQRQ	383...387	
166	ETALALLLL	217 ...224	centrale
87	ETALALL	217... 224	
156	<i>INTNSGP</i>	75... 81	N - Ter.
86	<i>Conformationnel</i>		
212	<i>Conformationnel</i>		
170	<i>Conformationnel</i>		

[0300] En outre, comme illustré notamment aux figures 18 et 19, ces anticorps ne présentent pas de réactivité en ELISA et/ou en WB, vis à vis de la protéine N du coronavirus humain 229 E.

Exemple 10 : Combinaisons des anticorps monoclonaux pour le développement d'un test d'immunocapture sensible et spécifique de l'antigène viral N dans le sérum ou les fluides biologiques des patients contaminés par le virus SARS Co V

[0301] Les anticorps listés ci-dessous ont été retenus en raison de leurs propriétés bien particulières pour une étude supplémentaire de capture et détection de la protéine virale N, dans le sérum des sujets ou patients.

[0302] Ces anticorps ont été produits en ascite sur souris, purifiés par chromatographie d'affinité et utilisés seuls ou en combinaison comme anticorps de capture, et comme anticorps signal.

[0303] Liste des anticorps sélectionnés pour le propos :

- Acm anti région C-ter (n° 28, 57, 143)
- Acm anti région centrale (n° 87, 166)
- Acm anti région N-ter (n° 156)
- Acm anti épitope discontinu, conformationnel (86)

1) Préparation des réactifs :

a) Plaques ELISA immunocapture

[0304] Les plaques sont sensibilisées avec les solutions d'anticorps à 5 µg/ml en tampon carbonate 0,1 M, pH.9,6.

EP 1 694 829 B1

Les solutions (monovalentes ou plurivalentes) sont déposées sous volume de 100 µl dans les puits et incubées pendant une nuit à température ambiante. Ces plaques sont ensuite lavées en tampon PBS (10 mM pH 7,4 additionné de 0,1% de Tween 20) puis saturées avec une solution de PBS additionnée de 0,3% de BSA et de 5% de Saccharose). Les plaques sont ensuite séchées puis conditionnées dans un sachet en présence d'un dessiccant. Elles sont prêtes à l'emploi.

b) Conjugués

[0305] Les anticorps purifiés ont été couplés à la peroxydase selon le protocole de Nakane (Nakane et al. - 1974, J.of Histo and cytochemistry, vol.22, p1084-1091) dans un rapport de une molécule d'IgG pour 3 molécules de peroxydase. Ces conjugués ont été purifiés par chromatographie d'exclusion et conservés concentrés (concentration comprise entre 1 à 2 mg/ml) en présence de 50% de glycerol et à -20°C. Ils sont dilués pour leur mise en oeuvre dans les essais à la concentration finale de 1 ou 2 µg/ml en tampon PBS (pH 7,4) additionné de 1% de BSA.

c) Autres réactifs

[0306]

- Sérums humains négatifs pour tous les marqueurs sériques des virus HIV, HBV, HCV et THLV
 - Pool de sérums humains négatifs additionné de 0,5% de Triton X 100
 - Ag viral inactivé : surnageant de culture virale inactivé par irradiation et inactivation vérifiée après mise en culture sur cellules sensibles - titre de la suspension avant inactivation environ 10^7 particules infectieuses par ml ou encore environ 5×10^9 particules virales physiques par ml d'antigène
 - Les échantillons d'Ag dilués en sérum humain négatif : ces échantillons ont été préparés par dilution au 1:100^e puis par dilution en série de raison 5.
- Ces échantillons non infectieux miment des échantillons humains supposés contenir des concentrations faibles à très faibles de nucléoprotéine virale N. De tels échantillons ne sont pas accessibles pour les travaux de routine
- Solution de lavage R2, solution de révélation TMB R8, chromogène R9 et solution d'arrêt R10, sont les réactifs génériques commercialisés par Bio-Rad dans ses trousse ELISA (ex : trousse *Platelia Pylori* ref.72778).

2) Mode opératoire

[0307] Les échantillons de sérums humains surchargés en Ag viral inactivé sont distribués à raison de 100 µl par cupule, directement dans les plaques sensibilisées, prêtes à l'emploi puis incubés pendant 1 heure à 37°C (incubation Bio-Rad IPS).

[0308] Le matériel non retenu par la phase solide est éliminé par 3 lavages (lavage avec solution R2 diluée, laveur automatique LP 35).

[0309] Les conjugués appropriés, dilués à la concentration finale de 1 ou 2 µg/ml sont distribués à raison de 100 µl par cupule et les plaques incubées à nouveau pendant une heure à 37° C (incubation IPS).

[0310] L'excès de conjugué est éliminé par 4 lavages successifs (solution R2 diluée - laveur LP 35).

[0311] La présence de conjugué fixé sur les plaques est révélée après addition de 100 µl de solution de révélation préparée avant emploi (1 ml de R9 et 10 ml de R8) et après incubation pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

[0312] La réaction enzymatique est finalement bloquée par addition de 100 µl de réactif R10 (H2SO4 IN) dans toutes les cupules.

[0313] La lecture est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque approprié à double longueur d'onde (450/620 nm).

[0314] Les résultats peuvent être interprétés en utilisant comme valeur seuil provisoire la moyenne d'au moins deux contrôles négatifs multiplié par un facteur 2 ou encore la moyenne de 100 sérums négatifs additionnée d'un incrément correspondant à 6 SD (*Standart Deviation* calculée sur les 100 mesures individuelles).

3) Résultats

[0315] Différentes combinaisons anticorps de capture et anticorps signal ont été testées en se fondant sur les propriétés des anticorps sélectionnés, et en évitant les combinaisons d'anticorps spécifiques des mêmes épitopes en phase solide et en conjugués.

[0316] Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les 4 combinaisons listées ci-dessous. Ces résultats sont reproduits dans le tableau IX ci-après.

1. Combinaison F/28

EP 1 694 829 B1

Phase solide (Acm 166 + 87 région centrale) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

2. Combinaison G/28

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationnel) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

3. Combinaison H/28

Phase solide (Acms 86, 166 et 87 région centrale et épitope conformationnel) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

4. Combinaison H/28 + 87

Phase solide (Acms 86, 166 et 87 région centrale et épitope conformationnel) : conjugué mixte anticorps 28 (C-ter) et 87 (central)

5. Combinaison G/87

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationnel) : conjugué anticorps 87 (région centrale)

Les 4 premières combinaisons présentent des performances équivalentes et reproduites, supérieures aux autres combinaisons mises en oeuvre (comme par exemple la combinaison G/87). Bien entendu, dans ces combinaisons, un anticorps monoclonal peut être remplacé par un autre anticorps reconnaissant le même épitope. Ainsi, on peut citer les variantes suivantes :

6. Variante de la combinaison F/28

Phase solide (Acm 87 uniquement) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

7. Variante de la combinaison G/28

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationnel) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

8. Variante de la combinaison H/28

Phase solide (Acms 86 et 87 région centrale et épitope conformationnel) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

9. Variante de la combinaison H/28 + 87

Phase solide (Acms 86 et 87 région centrale et épitope conformationnel) : conjugué mixte anticorps 57 (C-ter) et 87 (central)

Tableau IX : Contrôle d'immunoréactivité des Acm anti nucléoprotéines SARS CoV : densités optiques mesurées avec chaque combinaison d'anticorps, en fonction des dilutions de l'antigène viral inactivé.

N°	Dilution	F/28	G/28	G/87	H/28	H/28+87
0	1/100	5	5	3,495	3,900	5
1	1/500	3,795	3,814	1,379	3,702	3,804
2	½ 500	2,815	2,950	0,275	3,268	2,680
3	1/12500	0,987	1,038	0,135	1,374	0,865
4	1/62500	0,404	0,348	0,125	0,480	0,328
5	1/312500	0,285	0,211	0,123	0,240	0,215
6	Témoin	0,210	0,200	0,098	0,186	0,156
7	Témoin	0,269	0,153	0,104	0,193	0,202

[0317] La limite de détection de ces 4 essais expérimentaux correspond à la dilution d'antigène en sérum négatif 1: 62500. Une extrapolation rapide laisse supposer la détection de moins de 10^3 particules infectieuses par ml de sérums.

[0318] De cette étude, il ressort que les anticorps les mieux appropriés pour la capture de la nucléoprotéine virale native sont les anticorps spécifiques de la région centrale et/ou d'un épitope conformationnel, l'un et l'autre étant des anticorps sélectionnés également pour leur forte affinité pour l'antigène natif.

[0319] Ayant déterminé les meilleurs anticorps pour la composition de la phase solide, les anticorps à retenir en priorité pour la détection des antigènes fixés sur la phase solide, sont les anticorps complémentaires spécifiques d'un épitope dominant en région C-ter. L'emploi de tout autre anticorps complémentaire, mais spécifique des épitopes localisés en région N-ter de la protéine conduit à des résultats moyens ou médiocres.

Exemple 11 : Systèmes d'expression eucaryotes de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV)

1) Optimisation des conditions d'expression de la S du SRAS-CoV en cellules de mammifères.

[0320] Les conditions d'expression transitoire de la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV ont été optimisées en cellules de mammifères (293T, VeroE6).

[0321] Pour cela, un fragment d'ADN contenant le cDNA de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des

oligonucléotides 5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ATACTCGAGTT AT-GTGTAAATG TAATTTGACA CCCTTG-3' à partir du plasmide pSARS-S (C.N.C.M. n° I-3059) puis inséré entre les sites BamH1 et Xho1 du plasmide pTRIP Δ U3-CMV contenant un vecteur lentiviral TRIP (Sirven, 2001, Mol. Ther., 3, 438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S. Le fragment BamH1 et Xho1 contenant le cDNA de la S a ensuite été sous-cloné entre les BamH1 et Xho1 du plasmide d'expression eucaryote pcDNA3.1(+) (Clontech) pour obtenir le plasmide pcDNA-S. Le fragment Nhe1 et Xho1 contenant le cADN de la S a ensuite été sous-cloné entre les sites correspondants du plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-S. Les séquences WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte ("*Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element*") et les séquences CTE ("*constitutive transport element*") du rétrovirus simien de Mason-Pfizer ont été insérées dans chacun des deux plasmides pcDNA-S et pCI-S entre les sites Xho1 et Xba1 pour obtenir respectivement les plasmides pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE (figure 21). Le plasmide pCI-S-WPRE a été déposé à la CNCM, le 22 novembre 2004, sous le numéro I-3323. Tous les inserts ont été séquencés à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377.

[0322] La capacité des plasmides construits à diriger l'expression de la S du SRAS-CoV dans des cellules de mammifères a été recherchée après transfection de cellules VeroE6 (figure 22). Dans cette expérience, des monocouches de 5×10^5 cellules VeroE6 en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2 μ g des plasmides pcDNA (à titre de contrôle), pcDNA-S, pCI et pCI-S et 6 μ l de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂, des extraits cellulaires ont été préparé en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

[0323] Cette expérience (figure 22) montre que le plasmide pcDNA-S ne permet pas de diriger l'expression de la S du SRAS-CoV à des niveaux détectables tandis que le plasmide pCI-S permet une expression faible, proche de la limite de détection, qui peut être mise en évidence lorsque le film est surexposé. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'expression de la S a été recherchée par immunofluorescence (données non montrées). Cette impossibilité de détecter une expression efficace de la S ne peut pas être imputée aux techniques de détection utilisées puisque la protéine S peut être mise en évidence à la taille attendue (180 kDa) dans un extrait de cellules infectées par le SRAS-CoV ou dans un extrait de cellules VeroE6 infectées par le virus recombinant de la vaccine VV-TF7.3 et transfectées par le plasmide pcDNA-S. Dans cette dernière expérience, le virus VV-TF7.3 exprime l'ARN polymérase du phage T7 et permet la transcription cytoplasmique d'un ARN non coiffé susceptible d'être traduit efficacement. Cette expérience suggère que les défauts d'expression décrits ci-dessus sont dus à une incapacité intrinsèque du cADN de la S à être exprimé efficacement lorsque l'étape de transcription en ARN messager est réalisée au niveau nucléaire.

[0324] Dans une seconde expérience, l'effet des signaux CTE et WPRE sur l'expression de la S a été recherchée après transfection de cellules VeroE6 (figure 23A) et 293T (figure 23B) et selon un protocole similaire à celui décrit ci-dessus. Alors que l'expression de la S ne peut pas être mis en évidence après transfection des plasmides pcDNA-S-CTE et pcDNA-S-WPRE dérivés de pcDNA-S, l'insertion des signaux WPRE et CTE améliore fortement l'expression de la S dans le contexte du plasmide d'expression pCI-S.

[0325] Pour préciser ce résultat, une deuxième série d'expériences a été réalisée, où l'immunoempreinte est révélée de façon quantitative par luminescence et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). L'analyse des résultats obtenus avec le logiciel QuantityOne v4.2.3 (BioRad) montre que les séquences WPRE et CTE augmentent respectivement l'expression de la S d'un facteur 20 à 42 et 10 à 26 en cellules Vero E6 (Tableau X). En cellules 293T (Tableau X), l'effet de la séquence CTE est plus modéré (4 à 5 fois) tandis que celui de la séquence WPRE reste important (13 à 28 fois).

Tableau X analyse quantitative de l'effet des signaux CTE et WPRE sur l'expression de la S du SRAS-CoV :

Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 ou 293T par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE et analysés par western blot comme décrit dans la légende de la figure 22. Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression sont indiqués en fonction d'une échelle arbitraire où la valeur de 1 représente le niveau mesuré après transfection du plasmide pCI-S. Deux expériences indépendantes ont été réalisées pour chacun des deux types cellulaires. Dans l'expérience 1 sur cellules VeroE6, les transfusions ont été réalisées en dupliqués et les résultats sont indiqués sous la forme de moyennes et écart-types des niveaux d'expression mesurés.

Plasmide	Cellule	exp. 1	exp. 2
PCI	VeroE6	0,0	0,0
pCI-S	VeroE6	1,0 ± 0,1	1,0
pCI-S-CTE	VeroE6	9,8 ± 0,9	26,4
pCI-S-WPRE	VeroE6	20,1 ± 2,0	42,3
PCI	293T	0,0	0,0
PCI-S	293T	1,0	1,0
PCI-S-CTE	293T	4,6	4,0
PCI-S-WPRE	293T	27,6	12,8

[0326] En résumé, l'ensemble de ces résultats montre que l'expression dans des cellules de mammifères du cADN de la S du SRAS-CoV sous la dépendance de séquences promotrices de l'ARN polymérase II, requiert, pour être efficace, la présence d'un signal d'épissage ainsi que de l'une ou l'autre des séquences WPRE et CTE.

2) Obtention de lignées stables permettant l'expression de la S du SRAS-CoV

[0327] Le cADN de la protéine S du SRAS-CoV a été cloné sous la forme d'un fragment BamH1-Xho1 dans le plasmide pTRIPΔU3-CMV contenant un vecteur lentiviral défectif TRIP à DNA flap central (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 : 438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S (figure 24). La co-transfection transitoire selon Zennou et al (2000, Cell, 101 : 173-185) de ce plasmide, d'un plasmide d'encapsidation (p8.2) et d'un plasmide d'expression de la glycoprotéine d'enveloppe G du VSV (pHCMV-G) dans des cellules 293T a permis la préparation de pseudoparticules rétrovirales contenant le vecteur TRIP-S et pseudotypées par la protéine d'enveloppe G. Ces vecteurs TRIP-S pseudotypés ont été utilisés pour transduire des cellules 293T et FRhK-4 : aucune expression de la protéine S n'a pu être mise en évidence par western blot et immunofluorescence dans les cellules transduites (données non présentées).

[0328] Les cassettes d'expression optimales constituées du promoteur immédiat/précoce du virus CMV, d'un signal d'épissage, du cDNA de la S et de l'un ou l'autre des signaux post-transcriptionnels WPRE ou CTE décrites ci-dessus ont alors été substituées à la cassette EF1α-EGFP du vecteur d'expression lentiviral défectif à DNA FLAP central TRIPΔU3-EF1α (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 : 438-448) (figure 25). Ces substitutions ont été réalisées par une série de sous-clonages successifs des cassettes d'expression de S qui ont été excisées des plasmides pCT-S-CTE (BgIII-Apa1) ou respectivement pCI-S-WPRE (BgIII-Sall) puis insérées entre les sites Mlu1 et Kpn1 ou respectivement Mlu1 et Xho1 du plasmide TRIPΔU3-EF1α pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-S-CTE et pTRIP-SD/SA-S-WPRE, déposés à la CNCM, le 1^{er} décembre 2004, sous les numéros I-3336 et I-3334, respectivement. Des vecteurs pseudotypés ont été produits selon Zennou et al (2000, Cell, 101 : 173-185) et utilisés pour transduire des cellules 293T (10000 cellules) et FRhK-4 (15000 cellules) selon une série de 5 cycles successifs de transduction avec une quantité de vecteur correspondant à 25 ng (TRIP-SD/SA-S-CTE) ou 22 ng TRIP-SD/SA-S-WPRE) de p24 par cycle.

[0329] Les cellules transduites ont été clonées par dilution limite et une série de clones ont été analysés pour l'expression de la S du SRAS-CoV qualitativement par immunofluorescence (données non montrées), puis quantitativement par western blot (figure 25) à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S. Les résultats présentés dans la figure 25 montrent que les clones 2 et 15 de cellules FrhK4-s-CTE transduites par TRIP-SD/SA-S-CTE et les clones 4, 9 et 12 de cellules FRhK4-S-WPRE transduites par TRIP-SD/SA-S-WPRE permettent l'expression de la S du SRAS-CoV à des niveaux respectivement faibles et modérés si on les compare à ceux que l'on peut observer au cours de l'infection par le SRAS-CoV.

[0330] En résumé, les vecteurs TRIP-SD/SA-S-CTE et TRIP-SD/SA-S-WPRE permettent l'obtention de clones stables de cellules FRhK-4 et de façon similaire 293T exprimant la S du SRAS-CoV, alors que les essais réalisés avec le vecteur

EP 1 694 829 B1

"de base" TRIP-S sont restés infructueux, ce qui démontre la nécessité d'un signal d'épissage ainsi que de l'une, ou l'autre, des séquences CTE et WPRE pour l'obtention de clones cellulaires stables exprimant la protéine S.

[0331] En outre, ces modifications du vecteur TRIP (insertion d'un signal d'épissage et d'un signal post-transcriptionnel comme CTE et WPRE) pourraient s'avérer intéressantes pour améliorer l'expression d'autres cDNA que celui de la S.

3) Obtention de lignées stables permettant l'expression d'une forme soluble de la S du SRAS-CoV. Purification de cet antigène recombinant

[0332] Un cDNA codant pour une forme soluble de la protéine S (Ssol) a été obtenu en fusionnant les séquences codant pour l'ectodomaine de la protéine (acides aminés 1 à 1193) à celles d'une étiquette (FLAG : DYKDDDDK) *via* un linker BspEI codant pour le dipeptide SG. Pratiquement, pour obtenir le plasmide pcDNA-Ssol, un fragment d'ADN codant pour l'ectodomaine de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ACCTCCGGAT TTAATATATT GTCATATTT TCCCAA-3' à partir du plasmide pcDNA-S, puis inséré entre les sites uniques BamH1 et BspEI uniques d'un plasmide d'expression eucaryote pcDNA3.1(+)(Clontech) modifié contenant entre ses sites BamH1 et Xho1 la séquence de l'étiquette FLAG :

```

// GGATCC ...nnn... TCC GGA GAT TAT AAA GAT GAC GAC GAT AAA TAA
   BamH1           S  G  D  Y  K  D  D  D  D  K  ter
CTCGAG //
Xho1
    
```

[0333] Les fragments Nhe1-Xho1 et BamH1-Xho1, contenant le cADN de la S, ont ensuite été excisés du plasmide pcDNA-Ssol1, et sous-clonés entre les sites correspondants du plasmide pTRIP-SD/SA-S-CTE et du plasmide pTRIP-SD/SA-S-WPRE, respectivement, pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-Ssol-CTE et pTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE, déposés à la CNCM, le 1^{er} décembre 2004, sous les numéros I-3337 et I-3335, respectivement.

[0334] Des vecteurs pseudotypés ont été produits selon Zennou et coll. (2000, Cell, 101 : 173-185) et utilisés pour transduire des cellules FRhK-4 (15000 cellules) selon une série de 5 cycles successifs de transduction (15000 cellules) avec une quantité de vecteur correspondant à 24 ng (TRIP-SD/SA-Ssol-CTE) ou 40 ng TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE) de p24 par cycle. Les cellules transduites ont été clonées par dilution limite et une série de 16 clones transduits par TRIP-SD/SA-Ssol-CTE et de 15 clones par TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE ont été analysés pour l'expression du polypeptide Ssol par western blot révélé par un anticorps monoclonal anti-FLAG (figure 26 et données non montrées), ainsi que par un ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol qui a été mis au point dans ce but (Tableau XI et données non montrées). Une partie du processus de sélection des meilleurs clones sécréteurs est montré dans la figure 26. L'ELISA-capture repose sur l'utilisation de phases solides recouvertes d'anticorps polyclonaux de lapins immunisés par du SRAS-CoV purifié et inactivé. Ces phases solides permettent la capture du polypeptide Ssol sécrété dans les surnageants cellulaires, dont la présence est ensuite révélée par une série d'étapes impliquant successivement la fixation d'un anticorps monoclonal anti-FLAG (M2, SIGMA), d'anticorps biotinylés polyclonaux de lapin anti-IgG(H+L) de souris (Jackson) et d'un conjugué streptavidine-peroxydase (Amersham) puis l'addition de chromogène et de substrat (TMB + H₂O₂, KPL).

Tableau XI : analyse de l'expression de polypeptide Ssol par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. La sécrétion du polypeptide Ssol a été recherchée dans le surnageant d'une série de clones cellulaires isolés après transduction de cellules FRhK-4 par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. Les surnageants dilués au 1/50 ont été analysés par un test ELISA-capture spécifique de la S du SRAS-CoV.

	Vecteur	Clone	DO (450 nm)
	Témoin	-	0,031
	TRIP-SD/SA-Ssol-CTE	CTE2	0,547
		CTE3	0,668
		CTE9	0,171
		CTE12	0,208
		CTE13	0,133

(suite)

	Vecteur	Clone	DO (450 nm)
5	TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE	WPRE1	0,061
		WPRE10	0,134

[0335] La lignée cellulaire sécrétant les quantités les plus élevées de polypeptide Ssol dans le surnageant de culture est la lignée FRhK4-Ssol-CTE3. Elle a été soumise à une deuxième série de 5 cycles de transduction par le vecteur TRIP-SD/SA-Ssol-CTE dans des conditions similaires à celles décrites ci-dessus puis clonée. Le sous-clone sécrétant les quantités les plus élevées de Ssol a été sélectionné par une combinaison d'analyse par western blot et ELISA-capture : il s'agit du sous-clone FRhK4-Ssol-30, qui a été déposé à la CNCM, le 22 novembre 2004, sous le numéro I-3325.

[0336] La lignée FRhK4-Ssol-30 permet la production et la purification en quantité du polypeptide recombinant Ssol. Dans une expérience type où les conditions expérimentales de croissance, de production et de purification ont été optimisées, les cellules de la lignée FRhK4-Ssol-30 sont ensemencées en milieu de culture standard (DMEM sans pyruvate contenant 4.5g/l de glucose et supplémenté par 5% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) sous la forme d'une monocouche sous-confluente (1 million de cellules pour chaque 100 cm² dans 20 ml de milieu). A confluence, le milieu standard est remplacé par le milieu de sécrétion où la quantité de SVF est abaissée à 0.5% et la quantité de milieu réduite à 16 ml pour chaque 100 cm². Le surnageant de culture est prélevé après 4 à 5 jours d'incubation à 35°C et sous 5% de CO₂. Le polypeptide recombinant Ssol est purifié à partir du surnageant par l'enchaînement d'étapes de filtration sur membrane de polyethersulfone (PES) de 0.1 µm, de concentration par ultrafiltration sur une membrane de PES de point de coupure 50kD, de chromatographie d'affinité sur matrice anti-FLAG avec élution par une solution de peptide FLAG (DYKDDDDK) à 100 µg/ml en TBS (Tris 50mM pH 7.4, 150 mMNaCl) puis de chromatographie de gel filtration en TBS sur billes de sephadex G-75 (Pharmacia). La concentration du polypeptide recombinant Ssol purifié a été déterminée par test micro-BCA (Pierce) puis ses caractéristiques biochimiques analysées.

[0337] L'analyse par gel SDS à 8 % d'acrylamide coloré au nitrate d'argent met en évidence un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est d'environ 180kD et dont le degré de pureté peut être évalué à 98% (figure 27A). Par spectrométrie de masse SELDI-TOF (Cypherger), deux pics principaux sont mis en évidence : ils correspondent à des formes simplement, et doublement chargées d'un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est ainsi déterminée à 182,6 ± 3,7 kD (figures 27B et C). Après transfert sur membrane Prosorb et rinçage en TFA 0,1%, l'extrémité N-terminale du polypeptide Ssol a été séquencée en phase liquide par dégradation d'Edman sur 5 résidus (ABI494, Applied Biosystems) et déterminée comme étant SDLDR (figure 27D). Ceci démontre que le peptide signal localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine S du SRAS-CoV, composé des aa 1 à 13 (MFIFLLFLTLTSG) d'après une analyse réalisée avec le logiciel signalP v2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering, 10 : 1-6), est clivé du polypeptide Ssol mature. Le polypeptide recombinant Ssol est donc constitué des acides aminés 14 à 1193 de la protéine S du SRAS-CoV fusionnés en C-terminal à une séquence SGDYKDDDDK contenant la séquence de l'étiquette FLAG (soulignée). L'écart entre la masse molaire théorique du polypeptide Ssol nu (132,0 kD) et la masse molaire réelle du polypeptide mature (182,6 kD) suggère que le polypeptide Ssol est glycosylé.

[0338] Une préparation de polypeptide Ssol purifié et dont la concentration protéique a été déterminée par test micro-BCA, permet de réaliser une gamme étalon pour mesurer à l'aide du test ELISA-capture décrit plus haut les concentrations de Ssol présent dans les surnageants de culture et de revisiter les caractéristiques des lignées sécrétrices. Selon ce test, la lignée FRhK4-Ssol-CT3 sécrète 4 à 6 µg/ml de polypeptide Ssol tandis que la lignée FRhK4-Ssol-30 sécrète 9 à 13 µg/ml de Ssol après 4 à 5 jours de culture à confluence. En outre, le schéma de purification présenté plus haut permet en routine de purifier de 1 à 2 mg de polypeptide Ssol par litre de surnageant de culture.

Exemple 12 : Immunisation génique visant la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV)

[0339] L'effet d'un signal d'épissage et des signaux post-transcriptionnels WPRE et CTE a été analysé après immunisation génique de souris BALB/c (figure 28).

[0340] Pour cela, des souris BALB/c ont été immunisées à des intervalles de 4 semaines par injection dans le *tibialis anterior* d'une solution saline de 50 µg d'ADN plasmidique de pcDNA-S et pCI-S ainsi que, à titre de contrôle, par 50 µg d'ADN plasmidique de pcDNA-N (dirigeant l'expression de la N du SRAS-CoV) ou de pCI-HA (dirigeant l'expression de la HA du virus grippal A/PR/8/34) et les sérums immuns collectés 3 semaines après la 2ème injection. La présence d'anticorps dirigés contre la S du SRAS-CoV a été recherchée par ELISA indirect en utilisant comme antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres (TI) en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5

(différence entre DO mesurée sur lysat de cellules infectées et DO mesurée sur lysat de cellules non infectées) après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB additionné de H₂O₂ (KPL) (figure 28A).

[0341] Dans ces conditions, le plasmide d'expression pcDNA-S ne permet l'induction que de faibles titres d'anticorps dirigées contre la S du SRAS-CoV chez 3 souris sur 6 ($\text{LOG}_{10}(\text{TI})=1,9\pm 0,6$) alors que le plasmide pcDNA-N permet l'induction d'anticorps anti-N à des titres élevés ($\text{LOG}_{10}(\text{TI})= 3,9\pm 0,3$) chez tous les animaux, et les plasmides contrôles (pCI, pCI-HA) n'entraînent aucun anticorps détectable ($\text{LOG}_{10}(\text{TI})<1,7$). Le plasmide pCI-S muni d'un signal d'épissage permet l'induction d'anticorps à des titres élevés ($\text{LOG}_{10}(\text{TI})= 3,7\pm 0,2$), qui sont environ 60 fois supérieurs à ceux observés après injection du plasmide pcDNA-S ($p<10^{-5}$).

[0342] L'efficacité des signaux post-transcriptionnels a été étudiée en réalisant une étude dose-réponse des titres en anticorps anti-S induits chez la souris BALB/c en fonction de la quantité d'ADN plasmidique utilisé comme immunogène (2 µg, 10 µg et 50 µg). Cette étude (figure 28B) démontre que le signal post-transcriptionnel WPRE améliore fortement l'efficacité de l'immunisation génique lorsque de faibles doses d'ADN sont utilisées ($p<10^{-5}$ pour une dose de 2 µg d'ADN et $p<10^{-2}$ pour une dose de 10 µg), alors que l'effet du signal CTE reste marginal ($p=0,34$ pour une dose de 2 µg d'ADN).

[0343] Enfin, les anticorps induits chez la souris après immunisation génique neutralisent l'infectivité du SRAS-CoV *in vitro* (figures 29A et 29B) à des titres qui sont en rapport avec les titres mesurés par ELISA.

[0344] En résumé, l'utilisation d'un signal d'épissage et du signal post-transcriptionnel WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte améliore de façon considérable l'induction d'anticorps neutralisants dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique dirigeant l'expression du cADN de la S du SRAS-CoV.

Exemple 13 : Applications diagnostiques de la protéine S

[0345] La réactivité en ELISA du polypeptide recombinant Ssol a été analysée vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS.

[0346] Les sérums de cas probables de SRAS testés ont été choisis sur la base des résultats (positifs ou négatifs) d'analyse de leur réactivité spécifique vis-à-vis des antigènes natifs du SRAS-CoV par test d'immunofluorescence sur cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et/ou par test ELISA indirect en utilisant comme antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV. Les sérums de ces patients sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes. Tous les sérums de cas probables (cf Tableau XII) reconnaissent les antigènes natifs du SRAS-CoV, à l'exception du sérum 032552 du patient VTT, pour lequel l'infection par le SRAS-CoV n'a pas pu être confirmée par RT-PCR réalisée sur prélèvements respiratoires des jours 3, 8 et 12. Un panel de sérums témoin a été utilisé à titre de contrôle (sérums TV): il s'agit de sérums prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

Tableau XII : sérums de cas probables de SRAS

sérum	patient	jour de prélèvement
031724	JYK	7
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16
032791	JLB	3
033258	JLB	27
032703	JCM	8
033153	JCM	29

[0347] Des phases solides sensibilisées par le polypeptide recombinant Ssol ont été préparées par adsorption d'une solution de polypeptide Ssol purifié à 2 µg/ml en PBS dans les puits d'une plaque ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à 4°C et lavées avec du tampon PBS-Tween (PBS, 0,1% Tween20). Après saturation des plaques ELISA par une solution de PBS-lait écrémé à 10% (poids/volume) et lavage en PBS-tween, les sérums à tester (100 µl) sont dilués au 1/400 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween (PBS, 3% lait écrémé, 0,1% Tween) puis ajoutés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. Les plaques sont incubées 1h à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxidase (réf NA933V, Amersham) dilué au 1/4000 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween est ajouté, puis les plaques sont incubées une heure à 37°C. Après 6 lavages avec du tampon PBS-Tween, le chromogène (TMB) et le substrat (H₂O₂) sont ajoutés et les plaques sont incubées 10 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution 1N de H₃PO₄, puis l'absorbance est mesurée à 450 nm avec un référence à 620nm.

[0348] Les tests ELISA (figure 30) démontrent que le polypeptide recombinant Ssol est reconnu spécifiquement par les anticorps sériques de patients atteints de SRAS prélevés en phase moyenne ou tardive de l'infection (≥ 10 jours après le début des symptômes alors qu'il n'est pas reconnu de façon significative par les anticorps sériques de deux patients (JLB et JCM) prélevés en phase précoce de l'infection (3 à 8 jours après le début des symptômes) ni par des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS. Les anticorps sériques des patients JLB et JCM montrent une séro-conversion entre les jours 3 et 27 pour le premier et 8 et 29 pour le second après le début des symptômes, ce qui confirme la spécificité de la réactivité de ces sérums vis-à-vis du polypeptide Ssol.

[0349] En conclusion, ces résultats démontrent que le polypeptide recombinant Ssol peut être utilisé comme antigène pour la mise au point d'un test ELISA de diagnostic sérologique de l'infection par le SRAS-CoV.

Exemple 14 : Applications vaccinales de la protéine S soluble recombinante

[0350] L'immunogénicité du polypeptide recombinant Ssol a été étudiée chez la souris.

[0351] Pour cela, un groupe de 6 souris a été immunisé à 3 semaines d'intervalle avec 10 µg de polypeptide recombinant Ssol adjuvé par 1 mg d'hydroxyde d'aluminium (Alu-gel-S, Serva) dilué en PBS. Trois immunisations successives ont été réalisées et les sérums immuns ont été prélevés 3 semaines après chacune des immunisations (IS1, IS2, IS3). A titre de contrôle, un groupe de souris (groupe mock) a reçu de l'hydroxyde d'aluminium seul selon le même protocole.

[0352] Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931 V, Amersham) et du TMB additionné de H₂O₂ (KPL). Cette analyse (figure 31) montre que l'immunisation par le polypeptide Ssol induit chez la souris dès la première immunisation des anticorps dirigés contre la forme native de la protéine de spicule du SRAS-CoV présente dans le lysat de cellules VeroE6 infectées. Après 2 puis 3 immunisations, les titres en anticorps anti-S deviennent très élevés.

[0353] Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité du SRAS-CoV. 4 points de séroneutralisation sur cellules FRhK-4 (100 TCID₅₀ de SRAS-CoV) sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4. Cette analyse montre que les anticorps induits chez la souris par le polypeptide Ssol sont neutralisants : les titres observés sont très élevés après 2 puis 3 immunisations (supérieurs à 2560 et 5120 respectivement, Tableau XIII).

Tableau XIII : induction d'anticorps dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation avec le polypeptide recombinant Ssol. Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité de 100 TCID₅₀ du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4.

groupe	sérums	Ac. Neutralisants
Mock	pi	< 20
	IS1	< 20
	IS2	< 20
	IS3	< 20

(suite)

groupe	sérums	Ac. Neutralisants
Ssol	pi	< 20
	IS1	57
	IS2	> 2560
	IS3	> 5120

[0354] Les titres neutralisants observés chez les souris immunisées avec le polypeptide Ssol atteignent des niveaux très supérieurs aux titres observés par Yang et coll. chez la souris (2004, Nature, 428: 561-564) et à ceux observés par Buchholz chez le hamster (2004, PNAS 101 : 9804-9809), qui protègent respectivement la souris et le hamster de l'infection par le SRAS-CoV. Il est donc vraisemblable que les anticorps neutralisants induits chez la souris après immunisation par le polypeptide Ssol protègent ces animaux contre l'infection par le SRAS-CoV.

Exemple 15 : Gène synthétique optimisé pour l'expression en cellules de mammifères de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV).

1) Conception du gène synthétique

[0355] Un gène synthétique codant pour la protéine de spicule du SRAS-CoV a été conçu à partir du gène de l'isolat 031589 (plasmide pSARS-S, C.N.C.M. n° I-3059) de façon à permettre des niveaux d'expression élevés dans des cellules de mammifères et en particulier dans les cellules d'origine humaine.

[0356] Pour cela :

- l'usage des codons du gène sauvage de l'isolat 031589 a été modifié de façon à se rapprocher du biais observé chez l'homme et à améliorer l'efficacité de traduction du mRNA correspondant
- le contenu global en GC du gène a été augmenté de façon à prolonger la demi-vie du mRNA correspondant
- les motifs, éventuellement cryptiques, susceptibles d'interférer avec une expression efficace du gène ont été supprimés (sites donneurs et accepteurs d'épissage, signaux de polyadénylation, séquences très riches (>80%) ou très pauvres (<30%) en GC, séquences répétées, séquences impliquées dans la formation de structures secondaires de l'ARN, boîtes TATA)
- un deuxième codon STOP a été ajouté pour permettre une terminaison efficace de la traduction.

[0357] En outre, des motifs CpG ont été introduits dans le gène de façon à augmenter son immunogénicité comme vaccin à ADN. Afin de faciliter la manipulation du gène synthétique, deux sites de restriction BamH1 et Xho1 ont été placés de part et d'autre de la phase ouverte de lecture de la protéine S, et les sites de restriction BamH1, Xho1, Nhe1, Kpn1, BspEI et Sal1 ont été évités dans le gène synthétique.

[0358] La séquence du gène synthétique conçu (gène 040530) est donnée en SEQ ID No: 140.

[0359] Un alignement du gène synthétique 040530 avec la séquence du gène sauvage de l'isolat 031589 du SRAS-CoV déposé à la C.N.C.M. sous le numéro I-3059 (SEQ ID NO : 4, plasmide pSARS-S) est présenté dans la figure 32.

2) Constructions plasmidiques

[0360] Le gène synthétique SEQ ID No: 140 a été assemblé à partir d'oligonucléotides synthétiques et cloné entre les sites Kpn1 et Sac1 du plasmide pUC-Kana pour donner le plasmide 040530pUC-kana. La séquence nucléotidique de l'insert du plasmide 040530pUC-kana a été vérifiée par séquençage automatique (Applied).

[0361] Un fragment Kpn1-Xho1 contenant le gène synthétique 040530 a été excisé du plasmide 040530pUC-kana et sous-cloné entre les sites Nhe1 et Xho1 du plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-SSYNTH, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro I-3333.

[0362] Un gène synthétique codant pour la forme soluble de la protéine S a ensuite été obtenu en fusionnant les séquences synthétiques codant pour l'ectodomaine de la protéine S (acides aminés 1 à 1193) à celles de l'étiquette (FLAG : DYKDDDDK) via un linker BspEI codant pour le dipeptide SG. Pratiquement, un fragment d'ADN codant pour l'ectodomaine de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ACTAGCTAGC GGATC-CACCA TGTCATCTT CCTG -3' et 5'- AGTATCCGGAC TTGATGTA CT GCTCGTACTT GC-3' à partir du plasmide 040530pUC-kana, digéré par Nhe1 et BspEI puis inséré entre les sites uniques Nhe1 et BspEI du plasmide pCI-Ssol, pour donner le plasmide pCI-SCUBE, déposé à la CNCM le 1^{er} décembre 2004, sous le numéro 1-3332. (Les plasmides

pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE et pCI-Ssol-WPRE (déposé à la CNCM, le 22 novembre 2004, sous le numéro I-3324) avaient été précédemment obtenus par sous-clonage du fragment Kpn1-Xho1 excisé du plasmide pcDNA-Ssol (voir note technique de la DI 2004-106) entre les sites Nhe1 et Xho1 des plasmides pCI, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE respectivement.)

[0363] Les plasmides pCI-Scube et pCI-Ssol codent pour le même polypeptide recombinant Sso1.

3) Résultats

[0364] La capacité du gène synthétique codant pour la protéine S à diriger efficacement l'expression de la S du SRAS-CoV dans des cellules de mammifères a été comparée à celle du gène sauvage après transfection transitoire de cellules de primates (VeroE6) et de cellules humaines (293T).

[0365] Dans l'expérience présentée par la figure 33 et au Tableau XIV, des monocouches de 5×10^5 cellules VeroE6 ou 7×10^5 cellules 293T en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2 μ g des plasmides pCI (à titre de contrôle), pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth et 6 μ l de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂, des extraits cellulaires ont été préparés en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). L'immunoempreinte est révélée de façon quantitative par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad).

[0366] L'analyse des résultats obtenus avec le logiciel QuantityOne v4.2.3 (BioRad) montre que dans cette expérience, le plasmide pCI-Synth permet l'expression transitoire de la protéine S à des niveaux élevés dans les cellules VeroE6 et 293T, alors que le plasmide pCI-S ne permet pas d'induire une expression à des niveaux suffisants pour être détectée. Les niveaux d'expression observés sont de l'ordre de 2 fois supérieurs à ceux observés avec le plasmide pCI-S-WPRE.

Tableau XIV : utilisation d'un gène synthétique pour l'expression de la S du SRAS-CoV. Des extraits cellulaires préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 ou 293T par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression de la protéine S ont été mesurés en quantifiant les 2 bandes majoritaires repérées sur l'image (voir figure 33) et sont indiqués en fonction d'une échelle arbitraire où la valeur de 1 représente le niveau mesuré après transfection du plasmide pCI-S-WPRE.

plasmide	VeroE6	293T
pCI	0,0	0,0
pCI-S	≤ 0,1	≤ 0,1
pCI-S-CTE	0,5	≤ 0,1
pCI-S-WPRE	1,0	1,0
PCI-Ssynth	1,8	1,9

[0367] Dans un second temps, la capacité du gène synthétique Scube à diriger efficacement la synthèse et la sécrétion du polypeptide Ssol par des cellules de mammifères a été comparée à celle du gène sauvage après transfection transitoire de cellules de hamster (BHK-21) et de cellules humaines (293T).

[0368] Dans l'expérience présentée par le Tableau XV, des monocouches de 6×10^5 cellules BHK-21 et de 7×10^5 cellules 293T en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2 μ g des plasmides pCI (à titre de contrôle), pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE, pCI-Ssol-WPRE et pCI-Scube et 6 μ l de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂, les surnageants cellulaires ont été prélevés et analysés de façon quantitative pour la sécrétion du polypeptide Ssol par un test ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol.

[0369] L'analyse des résultats montre que, dans cette expérience, le plasmide pCI-Scube permet l'expression du polypeptide Ssol à des niveaux 8 fois (cellules BHK-21) à 20 fois (cellules 293T) plus élevés que le plasmide pCI-Ssol. Les niveaux d'expression observés sont de l'ordre de 2 fois (cellules 293T) à 5 fois (cellules BHK-21) supérieurs à ceux observés avec le plasmide pCI-Ssol-WPRE.

Tableau XV : utilisation d'un gène synthétique pour l'expression du polypeptide Ssol. Les surnageants ont été récoltés 48 heures après transfection de cellules BHK ou 293T par les plasmides pCI, pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE, pCI-Ssol-WPRE et pCI-Scube et analysés de façon quantitative pour la sécrétion du polypeptide Ssol par un test ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol. Les transfections ont été réalisées en dupliqués et les résultats sont indiqués sous la forme de moyennes et écart-types des concentrations de polypeptide Ssol (ng/ml) mesurées dans les surnageants.

Plasmide	BHK	293T
Pci	< 20	< 20
pCI-Ssol	< 20	56 ± 10
pCI-Ssol-CTE	< 20	63 ± 8
pCI-Ssol-WPRE	28 ± 1	531 ± 15
PCI-Scube	152 ± 6	1140 ± 20

[0370] En résumé, ces résultats montrent que l'expression dans des cellules de mammifères du gène synthétique 040530 codant pour la S du SRAS-CoV sous la dépendance de séquences promotrices de l'ARN polymérase II est bien plus efficace que celle du gène sauvage de l'isolat 031589. Cette expression est même plus efficace que celle dirigée par le gène sauvage en présence des séquences WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte.

4) Applications

[0371] L'utilisation du gène synthétique 040530 codant pour la S du SRAS-CoV ou de sa variante Scube codant pour le polypeptide Ssol est susceptible de remplacer avantageusement le gène sauvage dans de nombreuses applications où l'expression de la S est nécessaire à des niveaux élevés. En particulier pour :

- améliorer l'efficacité de l'immunisation génique par des plasmides du type pCI-Ssynth voire pCI-Ssynth-CTE ou pCI-Ssynth-WPRE
- établir de nouvelles lignées cellulaires exprimant des quantités plus élevées de la protéine S ou du polypeptide Ssol à l'aide de vecteurs lentiviraux recombinants porteurs du gène Ssynth ou du gène Scube respectivement
- améliorer l'immunogénicité des vecteurs lentiviraux recombinants permettant l'expression de la protéine S ou du polypeptide Ssol
- améliorer l'immunogénicité de vecteurs vivants permettant l'expression de la protéine S ou du polypeptide Ssol comme des virus recombinants de la vaccine ou des virus rougeole recombinants (voir exemples 16 et 17 ci-après)

Exemple 16 : Expression de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à l'aide de virus recombinants de la Vaccine.

Application vaccinale.

Application à la production d'une forme soluble de la protéine de spicule (S) et conception d'un test de sérologie du SRAS.

1) Introduction

[0372] Le but de cet exemple est d'évaluer la capacité de virus recombinants de la vaccine (VV) exprimant différents antigènes du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à constituer de nouveaux candidats vaccins contre le SRAS et un moyen de produire des antigènes recombinants en cellules de mammifères.

[0373] Pour cela, les inventeurs se sont intéressés à la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV, qui permet d'induire après immunisation génique chez l'animal des anticorps neutralisants l'infectivité du SRAS-CoV, ainsi qu'à une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, qui est composé de l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S fusionné en son extrémité C-ter à une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspEI codant pour le dipeptide SG. Ce polypeptide Ssol présente une antigénicité similaire à celle de la protéine S et permet, après injection à la souris sous la forme d'une protéine purifiée adjuvée en hydroxide d'aluminium, l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants contre le SRAS-CoV.

[0374] Les différentes formes du gène S ont été placées sous la dépendance du promoteur du gène 7.5K puis introduites au sein du locus de la thymidine kinase (TK) de la souche Copenhague du virus de la vaccine par double recombinaison homologue *in vivo*. Afin d'améliorer l'immunogénicité des virus vaccine recombinants, un promoteur tardif synthétique a été choisi à la place du promoteur 7.5K, pour augmenter la production de S et Ssol au cours des phases tardives du cycle viral.

[0375] Après avoir isolé les virus vaccine recombinants et vérifié leur capacité à exprimer l'antigène S du SRAS-CoV, leur capacité à induire chez la souris une réponse immunitaire contre le SRAS a été testée. Après avoir purifié l'antigène Ssol du surnageant de cellules infectées, un test ELISA de sérodiagnostic du SRAS a été conçu, et son efficacité a été évaluée à l'aide de sérums de cas probables de SRAS.

2) Construction des virus recombinants

[0376] Des virus recombinants de la vaccine dirigeant l'expression de la glycoprotéine S de l'isolat 031589 du SRAS-CoV et d'une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, sous la dépendance du promoteur 7.5K ont été obtenus. Dans le but d'augmenter les niveaux d'expression de S et Ssol, des virus recombinants dans lesquels les cDNA de S et de Ssol sont placés sous la dépendance d'un promoteur synthétique tardif ont également été obtenus.

[0377] Le plasmide pTG186poly est un plasmide de transfert pour la construction de virus recombinants de la vaccine (Kieny, 1986, Biotechnology, 4 :790-795). A ce titre, il contient le gène de la thymidine kinase du VV dans lequel a été inséré le promoteur du gène 7.5K suivi d'un site multiple de clonage permettant l'insertion de gènes hétérologues (figure 34A). Le promoteur du gène 7.5K contient en fait un tandem de deux séquences promotrices actives respectivement durant les phases précoces (P_E) et tardives (P_L) du cycle de réplication du virus de la vaccine. Les fragments BamH1-Xho1 ont été excisés des plasmides pTRIP-S et pcDNA-Ssol respectivement et insérés entre les sites BamH1 et Sma1 du plasmide pTG186poly pour donner les plasmides pTG-S et pTG-Ssol (figure 34A). Les plasmides pTG-S et pTG-Ssol ont été déposés à la CNCM, le 2 décembre 2004, sous les numéros I-3338 et I-3339, respectivement.

[0378] Les plasmides pTN480, pTN-S et pTN-Ssol ont été obtenus à partir des plasmides pTG186poly, pTG-S et pTG-Ssol respectivement, en substituant le fragment Nde1-Pst1 contenant le promoteur 7.5K par un fragment d'ADN contenant le promoteur tardif synthétique 480, qui a été obtenu par hybridation des oligonucléotides 5'- TATGAGCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTGGC ATATAAATAG ACTCGGCGCG CCATCTGCA-3' et 5'- GATGGCGCGC CGAGTCTATT TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAA.AAAAAGC TCA-3' (figure 34B). L'insert a été séquencé à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377. La séquence du promoteur synthétique tardif 480 tel que cloné dans les plasmides de transfert de la série pTN est indiquée figure 34C. Les plasmides pTN-S et pTN-Ssol ont été déposés à la CNCM, le 2 décembre 2004, sous les numéros I-3340 et I-3341, respectivement.

[0379] Les virus recombinants de la vaccine ont été obtenus par double recombinaison homologue *in vivo* entre la cassette TK des plasmides de transfert des séries pTG et pTN et le gène TK de la souche Copenhague du virus de la vaccine selon une procédure décrite par Kieny et coll. (1984, Nature, 312: 163-166). Brièvement, des cellules CV-1 sont transfectées à l'aide de DOTAP (Roche) par de l'ADN génomique de la souche copenhague du virus de la vaccine et chacun des plasmides de transfert des séries pTG et pTN décrits ci-dessus, puis surinfectées par le virus vaccine auxiliaire VV-ts7 pendant 24 heures à 33°C. Le virus auxiliaire est contre-sélectionné par incubation à 40°C pendant 2 jours puis les virus recombinants (phénotype TK-) sélectionnés par deux cycles de clonage sous milieu gélosé sur cellules 143Btk- en présence de BuDr (25 µg/ml). Les 6 virus VV-TG, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol ont été respectivement obtenus à l'aide des plasmides de transfert pTG186poly, pTG-S, pTG-Ssol, pTN480, pTN-S, pTN-Ssol. Les virus VV-TG et VV-TN n'expriment aucun gène hétérologue et ont été utilisés comme contrôle TK- dans les expériences. Les préparations de virus recombinants ont été réalisés sur monocouches de cellules CV-1 ou BHK-21 et le titre en unités formant plaque (u.f.p.) déterminé sur cellules CV-1 selon Earl et Moss (1998, Current Protocols in Molecular Biology, 16.16.1-16.16.13).

3) Caractérisation des virus recombinants

[0380] L'expression des transgènes codant la protéine S et le polypeptide Ssol a été recherchée par western blot.

[0381] Des monocouches de cellules CV-1 ont été infectées à une multiplicité de 2 par les différents virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol. Après 18 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂, des extraits cellulaires ont été préparés en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

[0382] Comme le montre la figure 35A, le virus recombinant VV-TN-S dirige l'expression de la protéine S à des niveaux

qui sont comparables à ceux que l'on peut observer 8h après infection par le SRAS-CoV mais qui sont bien plus élevés que ceux que l'on peut observer après infection par W-TG-S. Dans une deuxième expérience (figure 35B), l'analyse de quantités variables d'extraits cellulaires montre que les niveaux d'expression observés après infection par les virus de la série TN (VV-TN-S et VV-TN-Ssol) sont environ 10 fois plus élevés que ceux observés avec les virus de la série TG (VV-TG-S et VV-TG-Ssol respectivement). En outre, le polypeptide Ssol est sécrété dans le surnageant de cellules CV-1 infectées par le virus VV-TN-Ssol plus efficacement que dans le surnageant de cellules infectées par VV-TG-Ssol (figure 36A). Dans cette expérience, le virus VV-TN-Sflag a été utilisé à titre de contrôle, car il exprime la forme membranaire de la protéine S fusionnée en son extrémité C-ter à l'étiquette FLAG. La protéine Sflag n'est pas détectée dans le surnageant des cellules infectées par VV-TN-Sflag, démontrant que le polypeptide Ssol est bien sécrété de façon active après infection par VV-TN-Ssol.

[0383] Ces résultats démontrent que les virus vaccine recombinants sont bien porteurs des transgènes et permettent l'expression de la glycoprotéine du SRAS sous sa forme membranaire (S) ou sous une forme soluble et sécrétée (Ssol). Les virus vaccine porteurs du promoteur synthétique 480 permettent l'expression de S et la sécrétion de Ssol à des niveaux bien plus élevés que les virus porteurs du promoteur du gène 7.5K.

4) Application à la production d'une forme soluble de la S du SRAS-CoV. Purification de cet antigène recombinant et applications diagnostiques.

[0384] La lignée BHK-21 est la lignée cellulaire qui sécrète les quantités les plus élevées de polypeptide Ssol après infection par le virus VV-TN-Ssol parmi les lignées testées (BHK-21, CV1, 293T et FrhK-4, figure 36B); elle permet la production et la purification en quantité du polypeptide recombinant Ssol. Dans une expérience type où les conditions expérimentales d'infection, de production et de purification ont été optimisées, les cellules BHK-21 sont ensemencées en milieu de culture standard (DMEM sans pyruvate contenant 4.5g/l de glucose et supplémenté par 5% de TPB, 5% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) sous la forme d'une monocouche sous-confluite (10 millions de cellules pour chaque 100 cm² dans 25 ml de milieu). Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les cellules sont infectées à une M.O.I. de 0.03 et le milieu standard remplacé par le milieu de sécrétion où la quantité de SVF est abaissée à 0.5% et le TPB supprimé. Le surnageant de culture est prélevé après 2,5 jours d'incubation à 35°C et sous 5% de CO₂ et le virus de la vaccine inactivé par addition de triton X-100 (0,1%). Après filtration sur membrane de polyethersulfone (PES) de 0.1 µm, le polypeptide recombinant Ssol est purifié par une chromatographie d'affinité sur matrice anti-FLAG avec élution par une solution de peptide FLAG (DYKDDDDK) à 100 µg/ml en TBS (Tris 50mM pH 7.4, 150 mMNaCl).

[0385] L'analyse par gel SDS à 8 % d'acrylamide coloré au nitrate d'argent a mis en évidence un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est d'environ 180kD et dont le degré de pureté est supérieur à 90% (figure 37). La concentration du polypeptide recombinant Ssol purifié a été déterminée par comparaison avec les marqueurs de masse moléculaire et estimée à 24 ng/µl.

[0386] Cette préparation de polypeptide Ssol purifié permet de réaliser une gamme étalon pour mesurer à l'aide d'un test ELISA-capture les concentrations de Ssol présentes dans les surnageants de culture. Selon ce test, la lignée BHK-21 sécrète environ 1 µg/ml de polypeptide Ssol dans les conditions de production décrites plus haut. En outre, le schéma de purification présenté permet de purifier de l'ordre de 160 µg de polypeptide Ssol par litre de surnageant de culture.

[0387] La réactivité en ELISA du polypeptide recombinant Ssol a été analysée vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS.

[0388] Les sérums de cas probables de SRAS testés ont été choisis sur la base des résultats (positifs ou négatifs) d'analyse de leur réactivité spécifique vis à vis des antigènes natifs du SRAS-CoV par test d'immunofluorescence sur cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et/ou par test ELISA indirect en utilisant comme antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV. Les sérums de ces patients sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes. Tous les sérums de cas probables (cf Tableau XVI) reconnaissent les antigènes natifs du SRAS-CoV à l'exception du sérum 032552 du patient VTT, pour lequel l'infection par le SRAS-CoV n'a pas pu être confirmée par RT-PCR réalisée sur prélèvements respiratoires des jours 3, 8 et 12. Un panel de sérums témoin a été utilisé à titre de contrôle (sérums TV): il s'agit de sérums prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

Tableau XVI : sérums de cas probables de SRAS

sérum	patient	jour de prélèvement
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17

(suite)

sérum	patient	jour de prélèvement
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16

[0389] Des phases solides sensibilisées par le polypeptide recombinant Ssol ont été préparées par adsorption d'une solution de polypeptide Ssol purifié à 4 µg/ml en PBS dans les puits d'une plaque ELISA. Les plaques sont incubées une nuit à 4°C puis lavées avec du tampon PBS-Tween (PBS, 0,1% Tween20). Après lavage en PBS-tween, les sérums à tester (100 µl) sont dilués au 1/100 et 1/400 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween (PBS, 3% lait écrémé, 0,1% Tween) puis ajoutés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. Les plaques sont incubées 1h à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxidase (réf NA933V, Amersham) dilué au 1/4000 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween est ajouté puis les plaques sont incubées une heure à 37°C. Après 6 lavages avec du tampon PBS-Tween, le chromogène (TMB) et le substrat (H₂O₂) sont ajoutés et les plaques sont incubées 10 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution 1M de H₃PO₄ puis l'absorbance est mesurée à 450 nm avec une référence à 620nm.

[0390] Les tests ELISA (figure 38) démontrent que le polypeptide recombinant Ssol est reconnu spécifiquement par les anticorps sériques de patients atteints de SRAS prélevés en phase moyenne ou tardive de l'infection (≥ 10 jours après le début des symptômes), alors qu'il n'est pas reconnu de façon significative par les anticorps sériques des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS.

[0391] En conclusion, ces résultats démontrent que le polypeptide recombinant Ssol peut être purifié à partir du surnageant de cellules de mammifères infectées par le virus vaccine recombinant W-TN-Ssol et être utilisé comme antigène pour la mise au point d'un test ELISA de diagnostic sérologique de l'infection par le SRAS-CoV.

5) Applications vaccinales

[0392] L'immunogénicité des virus vaccine recombinants a été étudiée chez la souris.

[0393] Pour cela, des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés par voie i.v. à deux reprises à 4 semaines d'intervalle par 10⁶ u.f.p. de virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S, W-TG-Ssol, W-TN, W-TN-S et VV-TN-Ssol ainsi que, à titre de contrôle, VV-TG-HA qui dirige l'expression de l'hémagglutinine de la souche A/PR/8/34 du virus de la grippe. Les sérums immuns ont été prélevés 3 semaines après chacune des immunisations (IS1, IS2).

[0394] Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres (TI) en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB additionné de H₂O₂ (KPL). Cette analyse (figure 39A) montre que l'immunisation par le virus VV-TG-S et W-TN-S induit chez la souris dès la première immunisation des anticorps dirigés contre la forme native de la protéine de spicule du SRAS-CoV présente dans le lysat de cellules VeroE6 infectées. Les réponses induites par le virus VV-TN-S sont plus élevées que celles induites par le virus VV-TG-S après la première (TI=740 et TI=270 respectivement) et la deuxième (TI=3230 et TI=600 respectivement) immunisation. Le virus VV-TN-Ssol induit de forts titres d'anticorps anti-SRAS-CoV après deux immunisations (TI=640), alors que le virus VV-TG-Ssol induit une réponse à la limite de la détection (TI=40).

[0395] Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité du SRAS-CoV. 4 points de séroneutralisation sur cellules FRhK-4 (100 TCID₅₀ de SRAS-CoV) sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4. Cette analyse montre que les anticorps induits chez la souris par les virus vaccine exprimant la protéine S ou le polypeptide Ssol sont neutralisants et que les virus à promoteurs synthétiques sont des immunogènes plus efficaces que les virus porteurs du promoteur 7.5K : les titres les plus élevés (640) sont observés après 2 immunisations par le virus VV-TN-S (figure 39B).

[0396] Le pouvoir protecteur des anticorps neutralisants induits chez la souris après immunisation par les virus vaccine recombinants est évalué à l'aide d'une infection d'épreuve par le SRAS-CoV.

6) Autres applications

[0397] Des virus vaccine recombinants de troisième génération sont construits en substituant les séquences sauvages des gènes S et Ssol par des gènes synthétiques optimisés pour l'expression en cellules de mammifères, décrits ci-dessus. Ces virus vaccine recombinants sont susceptibles d'exprimer des quantités plus importantes des antigènes S et Ssol et donc de présenter une immunogénicité accrue.

[0398] Le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol peut être utilisé pour la production en quantité et la purification de l'antigène Ssol en vue d'applications diagnostiques (sérologie par ELISA) et vaccinales (vaccin sous-unitaire).

Exemple 17 : Virus recombinant de la rougeole exprimant la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV). Applications vaccinales.

1) Introduction

[0399] Le vaccin rougeole (MV) induit chez l'homme une immunité protectrice de longue durée après une seule injection (Hilleman, 2002, Vaccine, 20 : 651-665). La protection conférée est très robuste et repose sur l'induction d'une réponse en anticorps et d'une réponse cellulaire CD4 et CD8. Le génome du MV est très stable et aucune réversion vers la virulence des souches vaccinales n'a jamais été observée. Le virus de la rougeole appartient au genre des *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae* ; c'est un virus enveloppé dont le génome est un ARN monocaténaire de polarité négative de 16kb (figure 40A) et dont le cycle de réplication exclusivement cytoplasmique exclut toute possibilité d'intégration dans le génome de l'hôte. Le vaccin rougeole est ainsi l'un des vaccins vivants les plus efficaces et les plus sûrs utilisés dans la population humaine. L'équipe de Frédéric Tangy a développé récemment un vecteur d'expression sur la base de la souche Schwarz du virus de la rougeole, qui est la souche atténuée la plus sûre et la plus utilisée chez l'homme comme vaccin contre la rougeole. Cette souche vaccinale peut être isolée à partir d'un clone moléculaire infectieux en conservant son immunogénicité chez les primates ainsi que chez la souris susceptible à l'infection. Elle constitue, après insertion d'unités de transcription supplémentaires, un vecteur pour l'expression de séquences hétérologues (Combredet, 2003, J. Virol. 77 : 11546-11554). En outre, un MV Schwarz recombinant exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du virus West Nile (WNV) induit une réponse en anticorps efficace et de longue durée qui protège la souris d'une infection d'épreuve létale par le WNV (Despres et al, 2004, J. Infect. Dis., sous presse). Toutes ces caractéristiques font de la souche atténuée Schwarz du virus de la rougeole un candidat vecteur extrêmement prometteur pour la construction de nouveaux vaccins vivants recombinants.

[0400] Le but de cet exemple est d'évaluer la capacité de virus recombinants de la rougeole (MV) exprimant différents antigènes du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à constituer de nouveaux candidats vaccins contre le SRAS.

[0401] Les inventeurs se sont intéressés à la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV, qui permet d'induire après immunisation génique chez l'animal des anticorps neutralisants l'infectivité du SRAS-CoV, ainsi qu'à une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, qui est composé de l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S fusionné en son extrémité C-ter à une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspEI codant pour le dipeptide SG. Ce polypeptide Ssol présente une antigénicité similaire à celle de la protéine S et permet, après injection à la souris sous la forme d'une protéine purifiée adjuvée en hydroxide d'aluminium, l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants contre le SRAS-CoV.

[0402] Les différentes formes du gène S ont été introduites sous la forme d'une unité de transcription supplémentaire entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) dans le cADN de la souche Schwarz du MV précédemment décrite (Combredet, 2003, J. Virol. 77 : 11546-11554 ; Demande EP N° 02291551.6 du 20 juin 2002, et Demande EP n° 02291550.8 du 20 juin 2002). Après avoir isolé les virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et vérifié leur capacité à exprimer l'antigène S du SRAS-CoV, leur capacité à induire chez la souris puis chez le singe une réponse immunitaire protectrice contre le SRAS est testée.

2) Construction des virus recombinants

[0403] Le plasmide pTM-MVSchw-ATU2 (figure 40B) contient un cADN infectieux correspondant à l'antigénome de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) dans lequel une unité de transcription supplémentaire (ATU) a été introduite entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) (Combredet, 2003, Journal of Virology, 77 : 11546-11554). Des génomes recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol du virus de la rougeole ont été construits par l'insertion des ORFs de la protéine S et du polypeptide Ssol au sein de l'unité de transcription supplémentaire du vecteur MVSchw-ATU2.

[0404] Pour cela, un fragment d'ADN contenant le cADN de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ATACGTACGA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ATAGCGCGCT CAT-TATGTGT AATGTAATTT GACACCCTTG-3' en utilisant le plasmide pcDNA-S comme matrice puis inséré dans le

plasmide pCR@2.1-TOPO (Invitrogen) pour obtenir le plasmide pTOPO-S-MV. Les deux oligonucléotides utilisés contiennent des sites de restriction BsiW1 et BssHII, de façon à permettre l'insertion ultérieure dans le vecteur rougeole, et ont été conçus de façon à générer une séquence de 3774 nt incluant les codons d'initiation et de terminaison, afin de respecter la règle des 6 qui stipule que la longueur du génome d'un virus rougeole doit être divisible par 6 (Calain & Roux, 1993, J. Virol., 67 : 4822-4830 ; Schneider et al., 1997, Virology, 227 : 314-322). L'insert a été séquencé à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377.

[0405] Afin d'exprimer une forme soluble et sécrétée de la S du SRAS-CoV, un plasmide contenant l'ADNc du polypeptide Ssol correspondant à l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S du SRAS-CoV fusionné en son extrémité C-ter à la séquence d'une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspEI codant pour le dipeptide SG a ensuite été obtenu. Pour cela, un fragment d'ADN a été amplifié à l'aide des oligonucléotides 5'-CCATTCAAC AATTTGGCCG-3' et 5'-ATAGGATCCG CGCGCTCATT ATTTATCGTC GTCATCTTTA TAATC-3' à partir du plasmide pCDNA-Ssol puis inséré dans le plasmide pTOPO-S-MV entre les sites Sall et BamH1 pour obtenir le plasmide pTOPO-S-MV-SF. La séquence générée est longue de 3618 nt entre les sites BsiW1 et BssHII et respecte la règle des 6. L'insert a été séquencé comme indiqué ci-dessus.

[0406] Les fragments BsiW1-BssHII contenant les ADNc de la protéine S et du polypeptide Ssol ont ensuite été excisés par digestion des plasmides pTOPO-S-MV et pTOPO-S-MV-SF puis sous-clonés entre les sites correspondants du plasmide pTM-MV Schw-ATU2 pour donner les plasmides pTM-MV Schw2-SARS-S et pTM-MV Schw2-SARS-Ssol (figure 40B). Ces deux plasmides ont été déposés à la C.N.C.M. le 1^{er} décembre 2004, sous les numéros I-3326 et I-3327, respectivement.

[0407] Les virus rougeole recombinants correspondants aux plasmides pTM-MV Schw2-SARS-S et pTM-MV Schw2-SARS-Ssol ont été obtenus par génétique inverse selon le système reposant sur l'utilisation d'une lignée cellulaire auxiliaire, décrit par Radecke et coll. (1995, Embo J., 14, : 5773-5784) et modifié par Parks et coll. (1999, J. Virol., 73 : 3560-3566). Brièvement, les cellules auxiliaires 293-3-46 sont transfectées selon la méthode au phosphate de calcium par 5 µg des plasmides pTM-MV Schw2-SARS-S ou pTM-MV Schw2-SARS-Ssol et 0,02 µg du plasmide pEMC-La dirigeant l'expression de la polymérase L du MV (don de M.A. Billeter). Après une nuit d'incubation à 37°C, un choc thermique est réalisé pendant 2 heures à 43°C et les cellules transfectées sont transférées sur une monocouche de cellules Vero. Pour chacun des deux plasmides, des syncytia sont apparus après 2 à 3 jours de co-culture et ont été transférés successivement sur des monocouches de cellules Vero à 70% de confluence en boîtes de pétri de 35 mm puis en flacons de 25 et 75 cm². Quand les syncytia ont atteint 80-90% de confluence, les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir puis congelées et décongelées une fois. Après une centrifugation à basse vitesse, le surnageant contenant le virus est conservé en aliquot à -80°C. Les titres des virus recombinants MV Schw2-SARS-S et MV Schw2-SARS-Ssol ont été déterminés par dilution limite sur cellules Vero et le titre en dose infectant 50% des cupules (TCID₅₀) calculé selon la méthode de Kärber.

3) Caractérisation des virus recombinants

[0408] L'expression des transgènes codant la protéine S et le polypeptide Ssol a été recherchée par western blot et immunofluorescence.

[0409] Des monocouches de cellules Vero en flacons T-25 ont été infectées à une multiplicité de 0,05 par différents passages des deux virus MV Schw2-SARS-S et MV Schw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle. Quand les syncytia ont atteint 80 à 90% de confluence, des extraits cytoplasmiques ont été préparés dans un tampon d'extraction (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 1% triton-X-100, 0,1% SDS, 1% DOC) puis dilués en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide et transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

[0410] Des cellules Vero en monocouches sur lamelles de verre ont été infectées par les deux virus MV Schw2-SARS-S et MV Schw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle à des multiplicités d'infection de 0,05. Quand les syncytia ont atteint 90 à 100% (virus MV Schw2-SARS-Ssol) ou 30 à 40% (MV Schw2-SARS-S, MWSchw) de confluence, les cellules ont été fixées dans une solution de PBS-PFA 4%, perméabilisées par une solution de PBS contenant 0,2% de triton puis marquées par des anticorps polyclonaux de lapins hyperimmunisés par des virions purifiés et inactivés du SRAS-CoV et par un conjugué d'anticorps de chèvre anti-IgG(H+L) de lapin couplé au FITC (Jackson).

[0411] Comme le montrent les figures 41 et 42, les virus recombinants MV Schw2-SARS-S et MV Schw2-SARS-Ssol dirigent l'expression de la protéine S et du polypeptide Ssol respectivement à des niveaux comparables à ceux que l'on peut observer 8h après infection par le SRAS-CoV. L'expression de ces polypeptides est stable après 3 passages des virus recombinants en culture cellulaire. Ces résultats démontrent que les virus rougeole recombinants sont bien porteurs des transgènes et permettent l'expression de la glycoprotéine du SRAS sous sa forme membranaire (S) ou sous une

forme soluble (Ssol). On s'attend à ce que le polypeptide Ssol soit sécrété des cellules infectées par le virus MVSchw2-SARS-Ssol comme c'est le cas lorsque ce même polypeptide est exprimé dans des cellules de mammifères après transfection transitoire des séquences correspondantes (cf exemple 11 ci-dessus).

5 4) Applications

[0412] Ayant montré que les virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol permettent l'expression de la S du SRAS-CoV, leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice contre le SRAS-CoV chez la souris CD46^{+/+} IFN- α BR^{-/-}, qui est susceptible à l'infection par le MV, est évaluée. La réponse en anticorps des souris immunisées est évaluée par test ELISA contre les antigènes natifs du SRAS-CoV et pour leur capacité à neutraliser l'infectivité du SRAS-CoV *in vitro*, en utilisant les méthodologies décrites ci-dessus. Le pouvoir protecteur de la réponse sera évalué en mesurant la réduction de la charge virale pulmonaire 2 jours après une infection d'épreuve non létale par le SRAS-CoV.

[0413] Des virus rougeole recombinants de seconde génération sont construits en substituant les séquences sauvages des gènes S et Sol par des gènes synthétiques optimisés pour l'expression en cellules de mammifères, décrits à l'exemple 15 ci-dessus. Ces virus rougeole recombinants sont susceptibles d'exprimer des quantités plus importantes des antigènes S et Ssol et donc de présenter une immunogénicité accrue.

[0414] Alternativement, les gènes sauvages ou synthétiques codant pour la protéine S ou le polypeptide Ssol peuvent être insérés dans le vecteur rougeole MVSchw-ATU3 sous la forme d'une unité de transcription supplémentaire localisée entre les gènes H et L, puis les virus recombinants produits et caractérisés de façon similaire. Cette insertion est susceptible de générer des virus recombinants possédant des caractéristiques (multiplication du virus, niveau d'expression du transgène) différentes et possiblement une immunogénicité améliorée par rapport à ceux obtenus après insertion des transgènes entre les gènes P et N.

[0415] Le virus rougeole recombinant MVSchw2-SARS-Ssol peut être utilisé pour la production en quantité et la purification de l'antigène Ssol en vue d'applications diagnostiques et vaccinales.

25 Exemple 18 : Autres applications liées à la protéine S

[0416]

30 a) Les vecteurs lentiviraux permettant l'expression de la S ou de Ssol (voire de fragments de la S) peuvent constituer un vaccin recombinant contre le SRAS-CoV, pour être utilisé en prophylaxie humaine et vétérinaire. Afin de démontrer la faisabilité d'un tel vaccin, l'immunogénicité des vecteurs lentiviraux recombinants TRIP-SD/SA-S-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE est étudiée chez la souris.

35 b) Des anticorps monoclonaux sont produits à l'aide du polypeptide recombinant Ssol. D'après les résultats présentés à l'exemple 14 ci-dessus, ces anticorps ou du moins la majorité d'entre eux reconnaîtront la forme native de la S du SRAS-CoV et seront susceptibles d'applications diagnostiques et/ou prophylactiques.

c) Un test de sérologie du SRAS est mis au point avec le polypeptide Ssol utilisé comme antigène et la méthodologie du double épitope.

40 SEQUENCE LISTING

[0417]

45 <110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE PARIS 7
VAN DER WERF, Sylvie
ESCRIOU, Nicolas
CRESCENZO-CHAIGNE, Bernadette
50 MANUGUERRA, Jean-Claude
KUNST, Franck
CALLENDRET, Benoît
BETTON, Jean-Michel
LORIN, Valérie
55 GERBAUD, Sylvie
BURGUIERE, Ana Maria
AZEBI, Saliha
CHARNEAU, Pierre

EP 1 694 829 B1

TANGY, Frédéric
COMBREDÉ, Chantal
DELAGNEAU, Jean-François
MARTIN, Monique

5

<120> NOUVELLE SOUCHE DE CORONAVIRUS ASSOCIE AU SRAS ET SES APPLICATIONS

<130> 226-108ext

10

<150> FR 0314152

<151> 2003-12-02

<150> FR 0314151

<151> 2003-12-02

15

<160> 158

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 29746

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

25

<400> 1

30

35

40

45

50

55

EP 1 694 829 B1

atattagggtt tttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctggt 60
 ctctaaacga actttaaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcatgccta gtgcacctac 120
 5 gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tcgtccctct 180
 tctgcagact gcttacgggt tcgtccgtgt tgcagtcgat catcagcata cctagggttc 240
 gtccgggtgt gaccgaaagg taagatggag agccttgttc ttggtgtcaa cgagaaaaca 300
 10 cacgtccaac tcagtttgcc tgccttcag gttagagacg tgctagtgcg tggcttcggg 360
 gactctgtgg aagaggccct atcggaggca cgtgaacacc tcaaaaatgg cacttggtgt 420
 ctagtagagc tggaaaaagg cgtactgcc cagcttgaac agccctatgt gttcattaaa 480
 15 cgttctgatg ccttaagcac caatcacggc cacaaggctg ttgagctggt tgcagaaatg 540
 gacggcattc agtacggtcg tagcggata acactgggag tactcgtgcc acatgtgggc 600
 gaaaccccaa ttgcataccg caatgttctt cttcgtaaga acgtaataa gggagccggt 660
 20 ggtcatagct atggcatcga tctaaagtct tatgacttag gtgacgagct tggcactgat 720
 cccattgaag attatgaaca aaactggaac actaagcatg gcagtggtgc actccgtgaa 780
 ctcactcgtg agctcaatgg aggtgcagtc actcgctatg tcgacaaca tttctgtggc 840
 25 ccagatgggt accctcttga ttgcatcaaa gattttctcg cacgcgcggg caagtcaatg 900
 tgcactcttt ccgaacaact tgattacatc gagtcgaaga gaggtgtcta ctgctgccgt 960
 gaccatgagc atgaaattgc ctggttcaact gagcgtctctg ataagagcta cgagcaccag 1020
 30 acacccttcg aaattaagag tgccaagaaa tttgacactt tcaaagggga atgcccaaag 1080
 tttgtgtttc ctcttaactc aaaagtcaaa gtcattcaac cacgtgttga aaagaaaaag 1140
 actgagggtt tcatggggcg tatacgctct gtgtaccctg ttgcatctcc acaggagtgt 1200
 35 aacaatatgc acttgtctac cttgatgaaa tgtaatcatt gcgatgaagt ttcattggcag 1260
 acgtgcgact ttctgaaagc cacttgtagaa cattgtggca ctgaaaattt agttattgaa 1320
 ggacctacta catgtgggta cctacctact aatgctgtag tgaaaatgcc atgtcctgcc 1380
 40 tgtcaagacc cagagattgg acctgagcat agtgttgcag attatcacia ccaactcaaac 1440
 attgaaactc gactccgcaa gggaggtagg actagatggt ttggaggctg tgtgtttgcc 1500
 tatgttggct gctataataa gcgtgcctac tgggttcctc gtgctagtgc tgatattggc 1560
 45 tcaggccata ctggcattac tgggtgacaat gtggagacct tgaatgagga tctccttgag 1620

50

55

EP 1 694 829 B1

	atactgagtc	gtgaacgtgt	taacattaac	attgttggcg	atcttcattt	gaatgaagag	1680
	ggtgccatca	ttttggcatc	tttctctgct	tctacaagtg	cctttattga	cactataaag	1740
5	agtcttgatt	acaagtcttt	caaaaccatt	gttgagtcct	gcggttaacta	taaagttacc	1800
	aagggaaaagc	ccgtaaaagg	tgcttggaac	attggacaac	agagatcagt	tttaacacca	1860
	ctgtgtggtt	ttccctcaca	ggctgctggt	gttatcagat	caatttttgc	gcgcacactt	1920
10	gatgcagcaa	accactcaat	tcctgatttg	caaagagcag	ctgtcaccat	acttgatggt	1980
	atctctgaac	agtcattacg	tcttgtcgac	gccatggttt	atacttcaga	cctgctcacc	2040
	aacagtgtca	ttattatggc	atatgtaact	ggtggtcttg	tacaacagac	ttctcagtgg	2100
15	ttgtctaatac	ttttgggcac	tactgttgaa	aaactcaggc	ctatctttga	atggattgag	2160
	gcgaaactta	gtgcaggagt	tgaatttctc	aaggatgctt	gggagattct	caaatttctc	2220
	attacaggtg	tttttgacat	cgtaagggt	caaatacagg	ttgcttcaga	taacatcaag	2280
20	gattgtgtaa	aatgcttcat	tgatgttgtt	aacaaggcac	tcgaaatgtg	cattgatcaa	2340
	gtcactatcg	ctggcgcaaa	gttgcgatca	ctcaacttag	gtgaagtctt	catcgctcaa	2400
	agcaagggac	tttaccgtca	gtgtatacgt	ggcaaggagc	agctgcaact	actcatgcct	2460
25	cttaaggcac	caaaagaagt	aacctttctt	gaaggtgatt	cacatgacac	agtacttacc	2520
	tctgaggagg	ttgttctcaa	gaacggtgaa	ctcgaagcac	tcgagacgcc	cgttgatagc	2580
	ttcacaatg	gagctatcgt	tggcacacca	gtctgtgtaa	atggcctcat	gctcttagag	2640
30	attaaggaca	aagaacaata	ctgcgcattg	tctcctgggt	tactggctac	aaacaatgtc	2700
	tttcgcttaa	aagggggtgc	accaattaaa	ggtgtaacct	ttggagaaga	tactgtttgg	2760
	gaagttcaag	gttacaagaa	tgtgagaatc	acatttgagc	ttgatgaacg	tgttgacaaa	2820
35	gtgcttaatg	aaaagtgtc	tgtctacact	gttgaatccg	gtaccgaagt	tactgagttt	2880
	gcatgtgttg	tagcagaggc	tgttgtgaag	actttacaac	cagtttctga	tctccttacc	2940
	aacatgggta	ttgatcttga	tgagtggagt	gtagctacat	tctacttatt	tgatgatgct	3000
40	ggtgaagaaa	acttttcatc	acgtatgtat	tgttcctttt	accctccaga	tgaggaagaa	3060
	gaggacgatg	cagagtgtga	ggaagaagaa	attgatgaaa	cctgtgaaca	tgagtacggt	3120
	acagaggatg	attatcaagg	tctccctctg	gaatttggtg	cctcagctga	aacagttcga	3180
45	gttgaggaag	aagaagagga	agactggctg	gatgatacta	ctgagcaatc	agagattgag	3240
	ccagaaccag	aacctacacc	tgaagaacca	gttaatcagt	ttactgggta	tttaaaactt	3300
	actgacaatg	ttgccattaa	atgtgttgac	atcgtaagg	aggcacaaag	tgctaactct	3360
50	atggtgattg	taaatgctgc	taacatacac	ctgaaacatg	gtggtggtgt	agcaggtgca	3420
	ctcaacaagg	caaccaatgg	tgccatgcaa	aaggagagtg	atgattacat	taagctaaat	3480
	ggcctctta	cagtaggagg	gtcttgtttg	ctttctggac	ataatcttgc	taagaagtgt	3540
55	ctgcatgttg	ttggacctaa	cctaaatgca	ggtgaggaca	tccagcttct	taaggcagca	3600
	tatgaaaatt	tcaattcaca	ggacatctta	cttgcaccat	tgttgtcagc	aggcatatct	3660

EP 1 694 829 B1

ggtgctaac cacttcagtc tttacaagtg tgcgtgcaga cggttcgtac acaggtttat 3720
 attgcagtca atgacaaagc tctttatgag caggttgtca tggattatct tgataacctg 3780
 5 aagcctagag tggaagcacc taaacaagag gagccaccaa acacagaaga ttccaaaact 3840
 gaggagaaat ctgtcgtaca gaagcctgtc gatgtgaagc caaaaattaa ggcctgcatt 3900
 gatgaggtta ccacaacact ggaagaaact aagtttctta ccaataagtt actcttgttt 3960
 10 gctgatataca atggtaagct ttaccatgat tctcagaaca tgcttagagg tgaagatatg 4020
 tctttccttg agaaggatgc accttacatg gtaggtgatg ttatcactag tggatgatatc 4080
 acttggttg taatacctc caaaaaggct ggtggcacta ctgagatgct ctcaagagct 4140
 15 ttgaagaaag tgccagttga tgagtatata accacgtacc ctggacaagg atgtgctggt 4200
 tatacacttg aggaagctaa gactgctctt aagaaatgca aatctgcatt ttatgtacta 4260
 ccttcagaag cacctaagtc taaggaagag attctaggaa ctgtatcctg gaatttgaga 4320
 20 gaaatgcttg ctcatgctga agagacaaga aaattaatgc ctatatgcat ggatgttaga 4380
 gccataatgg caaccatcca acgtaagtat aaaggaatta aaattcaaga gggcatcgtt 4440
 gactatggtg tccgattctt cttttatact agtaaagagc ctgtagcttc tattattacg 4500
 25 aagctgaact ctctaaatga gccgcttgtc acaatgcaa ttggttatgt gacacatggt 4560
 tttaatcttg aagaggctgc gcgctgtatg cgttctctta aagctcctgc cgtagtgtca 4620
 gtatcatcac cagatgctgt tactacatat aatggatacc tcacttcgtc atcaaagaca 4680
 30 tctgaggagc actttgtaga aacagtttct ttggctggct cttacagaga ttggtcctat 4740
 tcaggacagc gtacagagtt aggtgttgaa tttcttaagc gtggtgacaa aattgtgtac 4800
 cacactctgg agagccccgt cgagtttcat cttgacggtg aggttctttc acttgacaaa 4860
 35 ctaaagagtc tcttatccct gcgggaggtt aagactataa aagtgttcac aactgtggac 4920
 aacactaatc tccacacaca gcttgtggat atgtctatga catatggaca gcagtttggg 4980
 ccaacatact tggatggtgc tgatgttaca aaaattaaac ctcatgtaa tcatgagggt 5040
 40 aagactttct ttgtactacc tagtgatgac aactacgta gtgaagcttt cgagtactac 5100
 catactcttg atgagagttt tcttggtagg tacatgtctg ctttaaacca cacaagaaa 5160
 tggaaatttc ctcaagttgg tggtttaact tcaattaaat gggctgataa caattgttat 5220
 ttgtctagtg ttttattagc acttcaacag cttgaagtca aattcaatgc accagcactt 5280
 45 caagaggctt attatagagc cctgtctggt gatgctgcta acttttgtgc actcactc 5340
 gcttacagta ataaaactgt tggcgagctt ggtgatgtca gagaaactat gacccatctt 5400
 ctacagcatg ctaatttggga atctgcaaag cgagttctta atgtggtgtg taaacattgt 5460
 50 ggtcagaaaa ctactacctt aacgggtgta gaagctgtga tgtatatggg tactctatct 5520
 tatgataatc ttaagacagg tgtttccatt ccatgtgtgt gtggctgta tgctacacaa 5580
 tatctagtac aacaagagtc ttcttttgtt atgatgtctg caccacctgc tgagtataaa 5640
 55 ttacagcaag gtacattctt atgtgcgaat gagtacactg gtaactatca gtgtgggtcat 5700

EP 1 694 829 B1

	tacactcata	taactgctaa	ggagaccctc	tatcgtattg	acggagctca	ccttacaaag	5760
	atgtcagagt	acaaaggacc	agtgactgat	gttttctaca	aggaaacatc	ttacactaca	5820
5	accatcaagc	ctgtgtcgta	taaactcgat	ggagttactt	acacagagat	tgaaccaaaa	5880
	ttggatgggt	attataaaaa	ggataatgct	tactatacag	agcagcctat	agaccttgta	5940
	ccaactcaac	cattaccaa	tgcgagtttt	gataatttca	aactcacatg	ttctaacaca	6000
10	aaatttgctg	atgatttaaa	tcaaatgaca	ggcttcacaa	agccagcttc	acgagagcta	6060
	tctgtcacat	tcttcccaga	cttgaatggc	gatgtagtgg	ctattgacta	tagacactat	6120
	tcagcgagtt	tcaagaaagg	tgctaaatta	ctgcataagc	caattgtttg	gcacattaac	6180
15	caggctacaa	ccaagacaac	gttcaaacca	aacacttggg	gtttacgttg	tctttggagt	6240
	acaaagccag	tagatacttc	aaattcattt	gaagttctgg	cagtagaaga	cacacaagga	6300
	atggacaatc	ttgcttgtga	aagtcaacaa	cccacctctg	aagaagtagt	ggaaaatcct	6360
20	accatacaga	aggaagtcac	agagtgtgac	gtgaaaacta	ccgaagttgt	aggcaatgtc	6420
	atacttaaac	catcagatga	aggtgttaaa	gtaacacaag	agttaggtca	tgaggatcct	6480
	atggctgctt	atgtggaaaa	cacaagcatt	accattaaga	aacctaata	gctttcacta	6540
25	gccttagggt	taaaaacaat	tgccactcat	ggatttgctg	caattaatag	tgttccttgg	6600
	agtaaaattt	tggttatgt	caaaccattc	ttaggacaag	cagcaattac	aacatcaaat	6660
	tgcgctaaga	gattagcaca	acgtgtgttt	aacaattata	tgcccttatgt	gtttacatta	6720
30	ttgttccaat	tgtgtacttt	tactaaaagt	accaattcta	gaattagagc	ttactacct	6780
	acaactattg	ctaaaaatag	tgtaagagt	gttgctaaat	tatgtttgga	tgccggcatt	6840
	aattatgtga	agtcacccaa	attttctaaa	ttgttcacaa	tcgctatgtg	gctattgttg	6900
35	ttaagtattt	gcttaggttc	tctaactctgt	gtaactgctg	cttttggtgt	actcttatct	6960
	aattttgggtg	ctccttctta	ttgtaatggc	gttagagaat	tgtatcttaa	ttcgtctaac	7020
	gttactacta	tggatttctg	tgaaggttct	tttcttgca	gcatttgttt	aagtggatta	7080
40	gactcccttg	attcttatcc	agctcttgaa	accattcagg	tgacgatttc	atcgtacaag	7140
	ctagacttga	caattttagg	tctggccgct	gagtgggttt	tggcatatat	gttgttcaca	7200
	aaattctttt	atttattagg	tctttcagct	ataatgcagg	tgttctttgg	ctattttgct	7260
45	agtcatttca	tcagcaattc	ttggctcatg	tggtttatca	ttagtattgt	acaaatggca	7320
	cccgtttctg	caatgggttag	gatgtacatc	ttctttgctt	cttttacta	catatggaag	7380
	agctatgttc	atatcatgga	tggttgacc	tcttcgactt	gcatgatgtg	ctataagcgc	7440
50	aatcgtgcca	cacgcgttga	gtgtacaact	attgttaatg	gcatgaagag	atctttctat	7500
	gtctatgcaa	atggaggccg	tggcttctgc	aagactcaca	attggaattg	tctcaattgt	7560
	gacacatttt	gactggtag	tacattcatt	agtgatgaag	ttgctcgtga	tttgtcactc	7620
	cagtttaaaa	gaccaatcaa	ccctactgac	cagtcacgt	atattgttga	tagtgttgct	7680
55	gtgaaaaatg	gcgcgcttca	cctctacttt	gacaaggctg	gtcaaaagac	ctatgagaga	7740

EP 1 694 829 B1

catccgctct cccattttgt caatttagac aatttgagag ctaacaacac taaaggttca 7800
 ctgcctatta atgtcatagt ttttgatggc aagtccaaat gcgacgagtc tgcttctaag 7860
 5 tctgcttctg tgtactacag tcagctgatg tgccaaccta ttctgttgct tgaccaagct 7920
 cttgtatcag acgttggaga tagtactgaa gtttccgta agatgtttga tgcttatgtc 7980
 gacacctttt cagcaacttt tagtgttcct atggaaaaac ttaaggcact tgttgctaca 8040
 10 gctcacagcg agttagcaaa ggggtgtagct ttagatggtg tcctttctac attcgtgtca 8100
 gctgcccgac aagggtgttg tgataccgat gttgacacaa aggatgttat tgaatgtctc 8160
 aaactttcac atcactctga cttagaagtg acaggtgaca gttgtaacaa tttcatgctc 8220
 15 acctataata aggttgaaaa catgacgcc agagatcttg gcgcatgtat tgactgtaat 8280
 gcaaggcata tcaatgcca agtagcaaaa agtcacaatg tttcactcat ctggaatgta 8340
 aaagactaca tgtctttatc tgaacagctg cgtaaacaaa ttcgtagtgc tgccaagaag 8400
 20 aacaacatac cttttagact aacttgtgct acaactagac aggttgtcaa tgtcataact 8460
 actaaaatct cactcaaggg tggttaagatt gttagtactt gttttaact tatgcttaag 8520
 gccacattat tgtgcttct tgctgcattg gtttgttata tcgttatgcc agtacataca 8580
 25 ttgtcaatcc atgatggtta cacaatgaa atcattggtt acaaagccat tcaggatggt 8640
 gtcactcgtg acatcatttc tactgatgat tgttttgcaa ataaacatgc tggttttgac 8700
 gcatggttta gccagcgtgg tggttcatac aaaaatgaca aaagctgcc tgtagtagct 8760
 30 gctatcatta caagagagat tggtttcata gtgcctggct taccgggtac tgtgctgaga 8820
 gcaatcaatg gtgacttctt gcattttcta cctcgtgttt ttagtgctgt tggcaacatt 8880
 tgctacacac cttccaaact cattgagtat agtgattttg ctacctctgc ttgcttctt 8940
 35 gctgctgagt gtacaatttt taaggatgct atgggcaaac ctgtgccata ttgttatgac 9000
 actaatttgc tagagggttc tatttcttat agtgagcttc gtccagacac tcgttatgtg 9060
 cttatggatg gttccatcat acagtttctt aacacttacc tggagggttc tgttagagta 9120
 40 gtaacaactt ttgatgctga gtactgtaga catggtacat gcgaaaggc agaagtaggt 9180
 atttgcctat ctaccagtgg tagatgggtt ctttaataatg agcattacag agctctatca 9240
 ggagttttct gtggtgttga tgcgatgaat ctcatagcta acatctttac tcctcttgtg 9300
 45 caacctgtgg gtgctttaga tgtgtctgct tcagtagtgg ctggtggtat tattgccata 9360
 ttggtgactt gtgctgccta ctactttatg aaattcagac gtgtttttgg tgagtacaac 9420
 catgttggtg ctgctaatgc acttttgttt ttgatgtctt tcactatact ctgtctggta 9480
 ccagcttaca gctttctgcc gggagtctac tcagtctttt acttgtactt gacattctat 9540
 50 ttcaccaatg atgtttcatt cttggctcac cttcaatggt ttgccatggt ttctctatt 9600
 gtgccttttt ggataacagc aatctatgta ttctgtattt ctctgaagca ctgccattgg 9660
 tttttaaca actatcttag gaaaagagtc atgtttaatg gagttacatt tagtaccttc 9720
 55 gaggaggctg ctttgtgtac ctttttgctc aacaaggaaa tgtacctaaa attgctgtagc 9780

EP 1 694 829 B1

gagacactgt tgccacttac acagtataac aggtatcttg ctctatataa caagtacaag 9840
 tatttcagtg gagccttaga tactaccagc tadcgtgaag cagcttgctg ccacttagca 9900
 5 aaggctctaa atgacttttag caactcaggt gctgatgttc tctaccaacc accacagaca 9960
 tcaatcactt ctgctgttct gcagagtggg tttaggaaaa tggcattccc gtcaggcaaa 10020
 gttgaagggg gcatggtaca agtaacctgt ggaactacaa ctcttaatgg attgtggttg 10080
 10 gatgacacag tatactgtcc aagacatgtc atttgcacag cagaagacat gcttaatcct 10140
 aactatgaag atctgctcat tcgcaaatcc aaccatagct ttcttgttca ggctggcaat 10200
 gttcaacttc gtgttattgg ccattctatg caaaattgtc tgcttaggct taaagttgat 10260
 15 acttctaacc ctaagacacc caagtataaa tttgtccgta tccaacctgg tcaaacattt 10320
 tcagttctag catgctacaa tggttcacca tctgggtgtt atcagtggtc catgagacct 10380
 aatcatacca ttaaagggtc tttccttaat ggatcatgtg gtagtgttgg ttttaacatt 10440
 20 gattatgatt gcgtgtcttt ctgctatatg catcatatgg agcttccaac aggagtacac 10500
 gctggtactg acttagaagg taaattctat ggtccatttg ttgacagaca aactgcacag 10560
 gctgcaggta cagacacaac cataacatta aatgttttgg catggctgta tgctgctgtt 10620
 25 atcaatggtg ataggtgggt tcttaataga ttcaccacta ctttgaatga ctttaacctt 10680
 gtggcaatga agtacaacta tgaacctttg acacaagatc atgttgacat attgggacct 10740
 ctttctgctc aaacaggaat tgccgtctta gatatgtgtg ctgctttgaa agagctgctg 10800
 30 cagaatggta tgaatggctg tactatcctt ggtagcacta ttttagaaga tgagtttaca 10860
 ccatttgatg ttgtagaca atgctctggg gttaccttcc aaggtaagtt caagaaaatt 10920
 gttaagggca ctcactattg gatgctttta actttcttga catcactatt gattcttggt 10980
 35 caaagtacac agtggctact gtttttcttt gtttacgaga atgctttctt gccatttact 11040
 cttgggatta tggcaattgc tgcactgtgct atgctgcttg ttaagcataa gcacgcattc 11100
 ttgtgcttgt ttctgttacc ttctcttgca acagttgctt actttaatat ggtctacatg 11160
 40 cctgctagct ggggtgatgc tatcatgaca tggcttgaat tggctgacac tagcttgtct 11220
 ggttataggc ttaaggattg tgttatgtat gcttcagctt tagttttgct tattctcatg 11280
 acagctcgca ctgtttatga tgatgctgct agacgtgttt ggacactgat gaatgtcatt 11340
 45 acacttgttt acaaagtcta ctatggtaat gctttagatc aagctatttc catgtgggcc 11400
 ttagttattt ctgtaacctc taactattct ggtgtcgta cgactatcat gtttttagct 11460
 agagctatag tgtttgtgtg tgttgagat taccattgt tatttattac tggcaacacc 11520
 ttacagtgta tcatgcttgt ttattgtttc ttaggctatt gttgctgctg ctactttggc 11580
 50 cttttctggt tactcaaccg ttacttcagg ctactcttg gtgtttatga ctacttggtc 11640
 tctacacaag aatttaggta tatgaactcc caggggcttt tgcctcctaa gagtagtatt 11700
 gatgctttca agcttaacat taagttgtg ggtattggag gtaaaccatg tatcaagggt 11760
 55 gctactgtac agtctaaaat gtctgacgta aagtgcacat ctgtggtact gctctcggtt 11820

EP 1 694 829 B1

:ttcaacaac ttagagtaga gtcattcttct aaattgtggg cacaaatgtgt acaactccac 11880
 aatgatattc ttcttgcaaa agacacaact gaagctttcg agaagatggt ttctcttttg 11940
 5 tctgttttgc tatccatgca ggggtgctgta gacattaata ggttgtgca ggaaatgctc 12000
 gataaccgtg ctactcttca ggctattgct tcagaattta gttctttacc atcatatgcc 12060
 gcttatgcc a ctgcccagga ggcctatgag caggctgtag ctaatggtga ttctgaagtc 12120
 10 gttctcaaaa agttaaagaa atctttgaat gtggctaaat ctgagtttga ccgtgatgct 12180
 gccatgcaac gcaagttgga aaagatggca gatcaggcta tgaccctaat gtacaaacag 12240
 gcaagatctg aggacaagag ggcaaaagta actagtgcata tgcaacaat gctcttact 12300
 15 atgcttagga agcttgataa tgatgcactt aacaacatta tcaacaatgc gcgtgatggt 12360
 tgtgttccac tcaacatcat accattgact acagcagcca aactcatggt tgttgtccct 12420
 gattatggta cctacaagaa cacttgtgat ggtaacacct ttacatatgc atctgcactc 12480
 20 tgggaaatcc agcaagttgt tgatgcggat agcaagattg ttcaacttag tgaataaac 12540
 atggacaatt caccaaat t ggcttggcct cttattgta cagctctaag agccaactca 12600
 gctgttaaac tacagaataa tgaactgagt ccagtagcac tacgacagat gtcctgtgca 12660
 25 gctggtacca cacaaacagc ttgtactgat gacaatgcac ttgcctacta taacaattcg 12720
 aagggaggta ggtttgtgct ggcttacta tcagaccacc aagatctcaa atgggctaga 12780
 ttcctaaga gtgatggtac aggtacaatt tacacagaac tggaaaccacc ttgtaggttt 12840
 30 gttacagaca cacaaaagg gcctaaagt aaatacttgt acttcatcaa aggcttaaac 12900
 aacctaata gaggtatggt gctgggcagt ttagctgcta cagtacgtct tcaggctgga 12960
 aatgctacag aagtacctgc caattcaact gtgctttcct tctgtgcttt tgcagtagac 13020
 35 cctgctaaag catataagga ttacctagca agtggaggac aaccaatcac caactgtgtg 13080
 aagatgttgt gtacacacac tggtagagga caggcaatta ctgtaacacc agaagctaac 13140
 atggaccaag agtcctttgg tggtagctca tgttgtctgt attgtagatg ccacattgac 13200
 40 catcctaatc ctaaaggatt ctgtgacttg aaaggttaagt acgtccaat acctaccact 13260
 tgtgctaag acccagtggg ttttacctt agaaacacag tctgtaccgt ctgcggaatg 13320
 tggaaagggt atggctgtag ttgtgaccaa ctccgcgaac ccttgatgca gtctgcggat 13380
 45 gcatcaacgt ttttaaacgg gtttgcggtg taagtgcagc ccgtcttaca ccgtgcggca 13440
 caggcactag tactgatgct gtctacagg cttttgatat ttacaacgaa aaagttgctg 13500
 gttttgcaaa gttcctaaaa actaattgct gtcgcttcca ggagaaggat gaggaaggca 13560
 50 atttattaga ctcttacttt gtagttaaga ggcatactat gtctaactac caacatgaag 13620
 agactattta taacttgggt aaagattgtc cagcgggtgc tgtccatgac tttttcaagt 13680
 ttagagtaga tggtagatg gtaccacata tatcacgtca gcgtctaact aaatacacia 13740
 55 tggctgattt agtctatgct ctacgtcatt ttgatgagg taattgtgat acattaaaag 13800
 aaatactcgt cacatacaat tgctgtgat atgattattt caataagaag gattggtatg 13860

EP 1 694 829 B1

acttcgtaga gaatcctgac atcttacgcg tatatgctaa cttaggtgag cgtgtacgcc 13920
 aatcattatt aaagactgta caattctgcg atgctatgcg tgatgcaggc attgtaggcg 13980
 5 tactgacatt agataatcag gatccttaatg ggaactggta cgatttcggt gatttcgtac 14040
 aagtagcacc aggctgcgga gttcctattg tggattcata ttactcattg ctgatgccca 14100
 tcctcacttt gactagggca ttggctgctg agtcccatat ggatgctgat ctcgcaaaac 14160
 10 cacttattaa gtgggatttg ctgaaatatg attttacgga agagagactt tgtctcttcg 14220
 accgttatth taaatattgg gaccagacat accatcccaa ttgtattaac tgtttggatg 14280
 ataggtgtat ccttcattgt gcaaaacttta atgtgttatt ttctactgtg tttccaccta 14340
 15 caagttttgg accactagta agaaaaatat ttgtagatgg tgttcctttt gttgtttcaa 14400
 ctggatacca ttttcgtgag ttaggagtcg tacataatca ggatgtaaac ttacatagct 14460
 cgcgtctcag tttcaaggaa cttttagtgt atgctgctga tccagctatg catgcagctt 14520
 20 ctggcaatth attgctagat aaacgacta catgcttttc agtagctgca ctaacaaaca 14580
 atgttgctth tcaaactgtc aaaccggta attttaataa agacttttat gactttgctg 14640
 tgtctaaagg tttctttaag gaaggaagtt ctgttgaact aaaacacttc tctttgctc 14700
 25 aggatggcaa cgctgctatc agtgattatg actattatcg ttataatctg ccaacaatgt 14760
 gtgatatcag acaactccta ttcgtagttg aagttgttga taaatactth gattgttacg 14820
 atggtggctg tattaatgcc aaccaagtaa tcgttaacaa tctggataaa tcagctggth 14880
 tcccattthaa taaatggggt aaggctagac tttattatga ctcaatgagt tatgaggatc 14940
 30 aagatgcact tttcgcgtat actaagcgta atgtcatccc tactataact caaatgaatc 15000
 ttaagtatgc cattagtgc aagaatagag ctcgcaccgt agctgggtgc tctatctgta 15060
 gtactatgac aatagacag tttcatcaga aattattgaa gtcaatagcc gccactagag 15120
 35 gagctactgt ggtaattgga acaagcaagt tttacgggtg ctggcataat atgttaaaaa 15180
 ctgtttacag tgatgtagaa actccacacc ttatggggtg ggattatcca aatgtgaca 15240
 gagccatgcc taacatgctt aggataatgg cctctcttgt tcttgctcgc aacataaca 15300
 40 cttgctgtaa cttatcacac cgtttctaca ggtagctaa cgagtgtgcg caagtattaa 15360
 gtgagatggc catgtgtggc ggctcactat atgttaaac aggtggaaca tcatccggtg 15420
 atgctacaac tgcttatgct aatagtgtct ttaacatttg tcaagctgtt acagccaatg 15480
 45 taaatgcact tctttcaact gatggtaata agatagctga caagtatgtc cgcaatctac 15540
 aacacaggct ctatgagtgt ctctatagaa atagggatgt tgatcatgaa ttcgtggatg 15600
 agttttacgc ttacctgctt aaacatttct ccatgatgat tctttctgat gatgccgttg 15660
 50 tgtgctataa cagtaactat gcggctcaag gtttagtagc tagcattaag aactttaagg 15720
 cagttcttht ttatcaaaat aatgtgttca tgtctgaggc aaaatgttgg actgagactg 15780
 accttactaa aggacctcac gaattttgct cacagcatac aatgctagtt aaacaaggag 15840
 55 atgattacgt gtacctgcct taccagatc catcaagaat attaggcgca ggctgthttg 15900

EP 1 694 829 B1

tcgatgatat tgtcaaaaca gatggtacac ttatgattga aaggttcgtg tcaactggcta 15960
 ttgatgctta cccacttaca aaacatccta atcaggagta tgctgatgtc tttcacttgt 16020
 5 atttacaata cattagaaag ttacatgatg agcttactgg ccacatggtg gacatgtatt 16080
 ccgtaatgct aactaatgat aacacctcac ggtactggga acctgagttt tatgaggcta 16140
 tgtacacacc acatacagtc ttgcaggctg taggtgcttg tgtattgtgc aattcacaga 16200
 10 cttcacttcg ttgCGGTGCC tgtattagga gaccattcct atgttgcaag tgctgctatg 16260
 accatgtcat ttcaacatca cacaaattag tgttgtctgt taatccctat gtttgcaatg 16320
 ccccaggttg tgatgtcact gatgtgacac aactgtatct aggaggtatg agctattatt 16380
 15 gcaagtcaca taagcctccc attagttttc cattatgtgc taatggtcag gtttttggtt 16440
 tatacaaaaa cacatgtgta ggcagtgaca atgtcactga cttcaatgCG atagcaacat 16500
 gtgattggac taatgctggc gattacatac ttgccaacac ttgtactgag agactcaagc 16560
 20 ttttcgCAGC agaaacgctc aaagccactg aggaaacatt taagctgtca tatggatttg 16620
 ccactgtacg cgaagtactc tctgacagag aattgcatct ttcattggag gttggaaaac 16680
 ctagaccacc attgaacaga aactatgtct ttactgggta ccgtgtaact aaaaatagta 16740
 25 aagtacagat tggagagtac acctttgaaa aaggtgacta tggatgatgct gttgtgtaca 16800
 gaggtactac gacatacaag ttgaatggtg gtgattactt tgtgttgaca tctcacactg 16860
 taatgccact tagtgcacct actctagtgc cacaagagca ctatgtgaga attactggct 16920
 30 tgtaccaac actcaacatc tcagatgagt tttctagcaa tgttgcaaat tatcaaaagg 16980
 tcggcatgca aaagtactct aactccaag gaccacctgg tactggtaag agtcattttg 17040
 ccatcggact tgctctctat taccatctg ctcgcatagt gtatacggca tgctctcatg 17100
 35 cagctgttga tgccctatgt gaaaaggcat taaaatattt gcccatagat aaatgtagta 17160
 gaatcatacc tgcgCGTGCG cgcgtagagt gttttgataa attcaaagtg aattcaacac 17220
 tagaacagta tgttttctgc actgtaaagc cattgccaga aacaactgct gacattgtag 17280
 40 tctttgatga aatctctatg gctactaatt atgacttgag tgttgcaaat gctagacttc 17340
 gtgcaaaaca ctacgtctat attggcgatc ctgctcaatt accagcccc cgcacattgc 17400
 tgactaaagg cacttagaa ccagaatatt ttaattcagt gtgcagactt atgaaaacaa 17460
 45 taggtccaga catgttcctt ggaactgtc gccgttgtcc tgctgaaatt gttgacactg 17520
 tgagtgcctt agtttatgac aataagctaa aagcacacaa ggataagtca gctcaatgct 17580
 tcaaaatggt ctacaaaggt gttattacac atgatgttc atctgcaatc aacagacctc 17640
 50 aataggcgt tgtaagagaa tttcttacac gcaatcctgc ttggagaaaa gctgttttta 17700
 tctcacctta taattcacag aacgctgtag cttcaaaaat cttaggattg cctacgcaga 17760
 ctggtgattc atcacaggt tctgaatatg actatgtcat attcacacaa actactgaaa 17820
 55 cagcacactc ttgtaatgtc aaccgcttca atgtggctat cacaagggca aaaattggca 17880
 ttttgtgcat aatgtctgat agagatcttt atgacaaact gcaatttaca agtctagaaa 17940

EP 1 694 829 B1

taccacgtcg caatgtggct acattacaag cagaaaatgt aactggactt ttttaaggact 18000
 gtagtaagat cactactggg cttcatccta cacaggcacc tacacacctc agcgttgata 18060
 5 taaagttcaa gactgaagga ttatgtgttg acataccagg cataccaaag gacatgacct 18120
 accgtagact catctctatg atggggtttca aatgaatta ccaagtcaat ggttacccta 18180
 atatgtttat cacccgcgaa gaagctattc gtcacgttcg tgcgtggatt ggctttgatg 18240
 10 tagagggctg tcatgcaact agagatgctg tgggtactaa cctacctctc cagctaggat 18300
 tttctacagg tgtaactta gtagctgtac cgactgggta tgttgacact gaaaataaca 18360
 cagaattcac cagagttaat gcaaacctc caccagggtga ccagtttaaa catcttatac 18420
 15 cactcatgta taaaggcttg ccctggaatg tagtgcgtat taagatagta caaatgctca 18480
 gtgatacact gaaaggattg tcagacagag tcgtgttcgt cctttgggcg catggctttg 18540
 agcttacatc aatgaagtac tttgtcaaga ttggacctga aagaacgtgt tgtctgtgtg 18600
 20 acaaacgtgc aacttgcttt tctacttcat cagatactta tgcctgctgg aatcattctg 18660
 tgggttttga ctatgtctat aaccattta tgattgatgt tcagcagtgg ggctttacgg 18720
 gtaaccttca gagtaacat gaccaacatt gccaggta ca tggaaatgca catgtggcta 18780
 25 gttgtgatgc tatcatgact agatgtttag cagtccatga gtgctttggt aagcgcgttg 18840
 attggtctgt tgaataccct attataggag atgaactgag ggtaattct gcttgacagaa 18900
 aagtacaaca catggttgtg aagtctgcat tgcttgctga taagtttcca gttcttcatg 18960
 30 acattggaaa tccaaaggct atcaagtgtg tgcctcaggc tgaagtagaa tggagttct 19020
 acgatgctca gccatgtagt gacaaagctt acaaaataga ggaactcttc tattcttatg 19080
 ctacacatca cgataaattc actgatggtg tttgtttggt ttggaattgt aacgttgatc 19140
 35 gttaccagc caatgcaatt gtgtgtagggt ttgacacaag agtcttgtca aacttgaact 19200
 taccaggctg tgatgggtggt agtttgtatg tgaataagca tgcattcac actccagctt 19260
 tcgataaaag tgcatttact aatttaaagc aattgccttt cttttactat tctgatagtc 19320
 40 cttgtgagtc tcatggcaaa caagtagtgt cggatattga ttatgttcca ctcaaactg 19380
 ctacgtgtat tacacgatgc aatttaggtg gtgctgtttg cagacacat gcaaatgagt 19440
 accgacagta cttggatgca tataatatga tgatttctgc tggatttagc ctatggattt 19500
 45 acaacaatt tgatacttat aacctgtgga atacatttac caggttacag agtttagaaa 19560
 atgtggctta taatgttgtt aataaaggac actttgatgg acacgccggc gaagcacctg 19620
 tttccatcat taataatgct gtttacacaa aggtagatgg tattgatgtg gagatctttg 19680
 50 aaaataagac aacacttctt gttaatgttg catttgagct ttgggctaag cgtaacatta 19740
 aaccagtgcc agagattaag atactcaata atttgggtgt tgatatcgct gctaatactg 19800
 taatctggga ctacaaaaga gaagccccag cacatgtatc tacaataggt gtctgcacaa 19860
 55 tgactgacat tgccaagaaa cctactgaga gtgcttgttc ttcacttact gtcttgtttg 19920
 atggttagagt ggaaggacag gtagacctt tttagaacgc ccgtaatggt gttttaataa 19980

EP 1 694 829 B1

cagaaggttc agtcaaaggc ctaaacacctt caaagggacc agcacaagct agcgtcaatg 20040
 gagtcacatt aattggagaa tcagtaaaaa cacagtttaa ctactttaag aaagtagacg 20100
 5 gcattattca acagttgcct gaaacctact ttactcagag cagagactta gaggatttta 20160
 agccagatc acaaatggaa actgactttc tcgagctcgc tatggatgaa ttcatacagc 20220
 gatataagct cgagggctat gccttcgaac acatcgttta tggagatttc agtcatggac 20280
 10 aacttggcgg tcttcattta atgataggct tagccaagcg ctcaacaagat tcaccactta 20340
 aattagagga ttttatccct atggacagca cagtgaaaaa ttacttcata acagatgcbc 20400
 aacaggttc atcaaaatgt gtgtgttctg tgattgatct tttacttgat gactttgtcg 20460
 15 agataataaa gtcacaagat ttgtcagtga tttcaaaagt ggtcaagggt acaattgact 20520
 atgctgaaat ttcattcatg ctttgggtga aggatggaca tgttgaaacc ttctacccaa 20580
 aactacaagc aagtcaagcg tggcaaccag gtgttgcgat gcctaacttg tacaagatgc 20640
 20 aaagaatgct tcttgaaaag tgtgaccttc agaattatgg tgaaaatgct gttataccaa 20700
 aaggaataat gatgaatgct gcaaagtata ctcaactgtg tcaactactta aatacactta 20760
 ctttagctgt accctacaac atgagagtta ttcactttgg tgctggctct gataaaggag 20820
 25 ttgcaccagg tacagctgtg ctcaacaat ggttgccaac tggcacacta cttgtcgtt 20880
 cagatcttaa tgacttcgtc tccgacgcag attctacttt aattggagac tgtgcaacag 20940
 tacatacggc taataaatgg gaccttatta ttagcgatat gtatgaccct aggaccaaac 21000
 atgtgacaaa agagaatgac tctaaagaag ggtttttcac ttatctgtgt ggatttataa 21060
 30 agcaaaaact agccctgggt ggttctatag ctgtaaagat aacagagcat tcttggaatg 21120
 ctgaccttta caagcttatg ggccatttct catggtggac agcttttggt acaaatgtaa 21180
 atgcatcatc atcggagca tttttaattg gggctaacta tcttggcaag ccgaaggaac 21240
 35 aaattgatgg ctataccatg catgctaact acatcttctg gaggaacaca aatcctatcc 21300
 agttgtcttc ctattcactc tttgacatga gcaaatttcc tcttaaatta agaggaactg 21360
 ctgtaatgct tcttaaggag aatcaaatca atgatatgat ttattctctt ctggaaaaag 21420
 40 gtaggcttat cattagagaa aacaacagag ttgtggtttc aagtgatatt cttgttaaca 21480
 actaaacgaa catgtttatt ttcttattat ttcttactct cactagtgggt agtgacctg 21540
 accggtgcac cacttttgat gatgttcaag ctccataatta cactcaacat acttcatcta 21600
 45 tgaggggggt ttactatcct gatgaaattt ttagatcaga cactctttat ttaactcagg 21660
 atttatttct tccattttat tctaattgta cagggtttca tactattaat catacgtttg 21720
 gcaaccctgt catacctttt aaggatggta tttattttgc tgccacagag aatcaaatg 21780
 50 ttgtccgtgg ttgggttttt ggttctacca tgaacaacaa gtcacagtcg gtgattatta 21840
 ttaacaattc tactaatggt gttatacagag catgtaactt tgaattgtgt gacaaccctt 21900
 tctttgctgt ttctaaacc atgggtacac agacacatac tatgatattc gataatgcat 21960
 55 ttaattgcac tttcgagtac atatctgatg cttttcgtct tgatgtttca gaaaagtcag 22020

EP 1 694 829 B1

gtaatnttaa acacttacga gagtttgtgt ttaaaaataa agatggggtt ctctatgttt 22080
 ataagggcta tcaacctata gatgtagttc gtgatctacc ttctggtttt aacactttga 22140
 5 aacctatntt taagttgcct cttgggtatta acattacaaa ttttagagcc attcttacag 22200
 ccttttcacc tgctcaagac atttggggca cgtcagctgc agcctatntt gttggctatt 22260
 taaagccaac tacatnttatg ctcaagtatg atgaaaatgg tacaatcaca gatgctgttg 22320
 10 attgttctca aaatccactt gctgaactca aatgctctgt taagagcttt gagattgaca 22380
 aaggaatnta ccagacctct aatntcaggg ttgttccctc aggagatgnt gtgagattcc 22440
 ctaatattac aaacttgtgt cctnttgag aggtntntaa tgctactaaa ttcccttctg 22500
 15 tctatgcatg ggagagaaaa aaaatntcta attgtgttgc tgattactct gtgctctaca 22560
 actcaacatt tntttcaacc tntaagtgt atggcgnttc tgccactaag ttgaatgatc 22620
 tntgcttctc caatgtctat gcagattctt ttgtagtcaa gggagatgat gtaagacaaa 22680
 20 tagcgccagg acaactggt gttatntgctg attataatta taaatntcca gatgattntca 22740
 tgggttgtgt ccttgccttg aatactagga acattgatgc tacttcaact ggtaattata 22800
 attataaata taggtatctt agacatggca agcttaggcc ctttgagaga gacatatcta 22860
 atgtgcntt ctcccctgat ggcaaacctt gcaccccacc tgctcttaat tnttattggc 22920
 25 cattaatga ttatggnttt tacaccacta ctggcattgg ctaccaacct tacagagttg 22980
 tagtactntc tnttgaactt tntaatgcac cggccacggt ttgtggacca aaattatcca 23040
 ctgaccttat taagaaccag tgtgtcaatt tntatntntaa tggactcact ggtactggtg 23100
 30 tgntaactcc ttcttcaaag agatntcaac cattntcaaca atntggccgt gatgnttctg 23160
 atntcactga tntcgntcga gatcctaaaa catctgaaat attagacatt tcaccttgc 23220
 cttntggggg tgtaagtgt attacacctg gaacaaatgc tntcatctgaa gttgctgttc 23280
 35 tatatcaaga tgntaactgc actgatgntt ctacagcaat tcatgcagat caactcacac 23340
 cagcttggcg catatattct actggaaaca atgtattcca gactcaagca ggctgtctta 23400
 taggagctga gcatgtcgac acttcttatg agtgcgacat tcctattgga gctggcattt 23460
 40 gtgctagtta ccatacagnt tctnttattac gtagtactag ccaaaaatct attgtggctt 23520
 atactatgtc tnttaggtgt gatagntcaa ttgcttactc taataacacc attgctatac 23580
 ctactaactt ntcaattagc attactacag aagtaatgcc tnttctatg gctaaaacct 23640
 45 ccgtagattg taatatgtac atctgcggag attctactga atgtgctaant ttgcttctcc 23700
 aatatggtag cttntgcaca caactaaatc gtgcactctc aggtattgct gctgaacagg 23760
 atcgcaacac acgtgaagt tntcgtcaag tcaaacaaat gtacaaaacc ccaactntga 23820
 50 aatatnttg tggntntaat tnttcacaaa tattacctga ccctctaaag ccaactaaga 23880
 ggtcntntat tgaggacttg ctctntaata aggtgacact cgctgatgct ggctntcatga 23940
 agcaatatgg cgaatgccta ggtgatatta atgctagaga tctcattntgt gcgcagaagt 24000
 55 tcaatggact tacagtgttg ccacctctgc tcactgatga tatgattgct gcctacactg 24060

EP 1 694 829 B1

ctgctctagt tagtgggtact gccactgctg gatggacatt tggtgctggc gctgctcttc 24120
 aaataccttt tgctatgcaa atggcatata ggttcaatgg cattggagtt acccaaatg 24180
 5 ttctctatga gaaccaaaaa caaatcgcca accaatttaa caaggcgatt agtcaaattc 24240
 aagaatcact tacaacaaca tcaactgcat tgggcaagct gcaagacgtt gttaaccaga 24300
 atgctcaagc attaaacaca cttgttaaac aacttagctc taattttggt gcaatttcaa 24360
 10 gtgtgctaaa tgatatacctt tcgcgacttg ataaagtcga ggcggaggta caaattgaca 24420
 ggttaattac aggcagactt caaagccttc aaacctatgt aacacaacaa ctaatcaggg 24480
 ctgctgaaat cagggcttct gctaactctt ctgctactaa aatgtctgag tgtgttcttg 24540
 15 gacaatcaaa aagagttgac ttttgtggaa agggctacca cttatgtcc ttcccacaag 24600
 cagccccgca tgggtgttgc ttctacatg tcacgtatgt gccatcccag gagaggaact 24660
 tcaccacagc gccagcaatt tgtcatgaag gcaaagcata cttccctcgt gaaggtgttt 24720
 20 ttgtgtttaa tggcacttct tggtttatta cacagaggaa cttcttttct ccacaaataa 24780
 ttactacaga caatacattt gtctcaggaa attgtgatgt cgttattggc atcattaaca 24840
 acacagttta tgatcctctg caacctgagc ttgactcatt caaagaagag ctggacaagt 24900
 25 acttcaaaaa tcatacatca ccagatggtg atcttggcga catttcaggc attaacgctt 24960
 ctgtcgtcaa cattcaaaaa gaaattgacc gcctcaatga ggtcgctaaa aatttaaagt 25020
 aatcactcat tgaccttcaa gaattgggaa aatattgagca atatattaa tggccttgggt 25080
 30 atgtttggct cggcttcatt gctggactaa ttgccatcgt catggttaca atcttgcttt 25140
 gttgcatgac tagttgttgc agttgcctca aggggtgatg ctcttgggt tcttgcgca 25200
 agtttgatga ggatgactct gagccagttc tcaaggggtg caaattacat tacacataaa 25260
 cgaacttatg gatttgttta tgagattttt tactcttggg tcaattactg cacagccagt 25320
 35 aaaaattgac aatgcttctc ctgcaagtac tgttcatgct acagcaacga taccgctaca 25380
 agcctcactc ctttctggat ggcttgttat tggcgttgca tttcttgctg ttttctagag 25440
 cgctacaaa ataattgctc tcaataaaaag atggcagcta gccctttata agggcttcca 25500
 40 gttcatttgc aatttactgc tgctatttgt taccatctat tcacatcttt tgcttgcgc 25560
 tgcaggatg gaggcgcaat ttttgtacct ctatgccttg atatattttc tacaatgcat 25620
 caacgcatgt agaattatta tgagatggtg gctttgttgg aagtgcaaat ccaagaacct 25680
 45 attactttat gatgccaact actttgtttg ctggcacaca cataactatg actactgtat 25740
 accatataac agtgtcacag atacaattgt cgttactgaa ggtgacggca tttcaacacc 25800
 aaaactcaaa gaagactacc aaattggtg ttattctgag gataggcact caggtgttaa 25860
 50 agactatgtc gttgtacatg gctatttcac cgaagtttac taccagcttg agtctacaca 25920
 aattactaca gacactggta ttgaaaatgc tacattcttc atctttaaca agcttggttaa 25980
 agaccaccg aatgtgcaaa tacacacaat cgacggctct tcaggagttg ctaatccagc 26040
 55 aatggatcca atttatgatg agccgacgac gactactagc gtgcctttgt aagcacaaga 26100

EP 1 694 829 B1

aagtgagtac gaacttatgt actcattcgt ttcggaagaa acagggtacgt taatagttaa 26160
 tagcgtactt ctttttcttg ctttcgtggt attccttgcta gtcacactag ccatccttac 26220
 5 tgcgcttcga ttgtgtgCGT actgctgcaa tattgttaac gtgagtttag taaaaccaac 26280
 ggtttacgtc tactcgcgtg ttaaaaatct gaactcttct gaaggagttc ctgatcttct 26340
 ggtctaaacg aactaactat tattattatt ctgtttggaa ctttaacatt gcttatcatg 26400
 10 gcagacaacg gtactattac cgttgaggag cttaaacaac tcctggaaca atggaaccta 26460
 gtaatagggt tcctattcct agcctggatt atgttactac aatttgccta ttctaactcg 26520
 aacaggtttt tgtacataat aaagcttggt ttcctctggc tcttgtggcc agtaacactt 26580
 15 gcttgttttg tgcttgctgc tgtctacaga attaattggg tgactggcgg gattgCGatt 26640
 gcaatggctt gtattgtagg cttgatgtgg cttagctact tcgttgcttc cttcaggctg 26700
 tttgctcgta cccgctcaat gtggtcattc aaccagaaa caaacattct tctcaatgtg 26760
 20 cctctccggg ggacaattgt gaccagaccg ctcattgaaa gtgaacttgt cattgggtgct 26820
 gtgatcattc gtggtcactt gcgaatggcc ggacactccc tagggcgtg tgacattaag 26880
 gacctgcaa aagagatcac tgtggctaca tcacgaacgc tttcttatta caaattagga 26940
 25 gcgtcgcagc gtgtaggcac tgattcaggt tttgctgcat acaaccgcta ccgtattgga 27000
 aactataaat taaatacaga ccacgccggt agcaacgaca atattgcttt gctagtacag 27060
 taagtgacaa cagatgtttc atcttgttga cttccagggt acaatagcag agatattgat 27120
 30 tatcattatg aggactttca ggattgctat ttggaatctt gacgttataa taagttcaat 27180
 agtgagacaa ttatttaagc ctctaactaa gaagaattat tcggagttag atgatgaaga 27240
 acctatggag ttagattatc cataaaacga acatgaaaat tattctcttc ctgacattga 27300
 35 ttgtatttac atcttgcgag ctatatcact atcaggagtg tgtagaggt acgactgtac 27360
 tactaaaaga accttgccca tcaggaacat acgagggcaa ttcaccattt caccctcttg 27420
 ctgacaataa atttgacta acttgacta gcacacactt tgcttttgct tgtgctgacg 27480
 gtactcgaca tacctatcag ctgCGtgcaa gatcagtttc accaaaactt ttcacgac 27540
 40 aagaggaggt tcaacaagag ctctactcgc cacttttct cattgttgct gctctagtat 27600
 ttttaatact ttgcttcacc attaagagaa agacagaatg aatgagctca ctttaattga 27660
 cttctatttg tgcttttag ctttctgct attccttgtt ttaataatgc ttattatatt 27720
 45 ttggttttca ctcgaaatcc aggatctaga agaacttgt accaaagtct aaacgaacat 27780
 gaaacttctc attgttttga cttgtatttc tctatgcagt tgcatatgca ctgtagtaca 27840
 gcgctgtgca tctaataaac ctcatgtgct tgaagatcct tgtaaggtag aacactaggg 27900
 50 gtaatactta tagcactgct tggcttttgct ctctaggaaa ggttttacct tttcatagat 27960
 ggcacactat ggttcaaaca tgcacaccta atgttactat caactgtcaa gatccagctg 28020
 gtgggtcgcct tatagctagg tgttggtacc ttcattgaagg tcaccaact gctgattta 28080
 55 gagacgtact tgttgtttta aataaacgaa caaattaaaa tgtctgataa tggaccccaa 28140

EP 1 694 829 B1

tcaaaccaac gtagtgcccc ccgcattaca tttggtggac ccacagattc aactgacaat 28200
 aaccagaatg gaggacgcaa tggggcaagg ccaaaacagc gccgaccca aggtttaccc 28260
 5 aataatactg cgtcttggtt cacagctctc actcagcatg gcaaggagga acttagattc 28320
 cctcgaggcc agggcgttcc aatcaacacc aatagtggtc cagatgacca aattggctac 28380
 taccgaagag ctacccgacg agttcgtggt ggtgacggca aatgaaaga gctcagcccc 28440
 10 agatggtact tctattacct aggaactggc ccagaagctt cacttcccta cggcgctaac 28500
 aaagaaggca tcgtatgggt tgcaactgag ggagccttga atacaccaa agaccacatt 28560
 ggcacccgca atcctaataa caatgctgcc accgtgctac aacttctca aggaacaaca 28620
 15 ttgccaaaag gcttctacgc agaggggaagc agaggcggca gtcaagcctc ttctcgctcc 28680
 tcatcacgta gtcgcggtaa ttcaagaaat tcaactcctg gcagcagtag gggaaattct 28740
 cctgctcga tggctagcgg aggtggtgaa actgccctcg cgctattgct gctagacaga 28800
 20 ttgaaccagc ttgagagcaa agtttctggt aaaggccaac aacaacaagg ccaaactgtc 28860
 actaagaaat ctgctgctga ggcatctaaa aagcctcgcc aaaaacgtac tgccacaaaa 28920
 cagtacaacg tcaactcaagc atttgggaga cgtggtccag aacaaccca aggaaatttc 28980
 25 ggggaccaag acctaatacag acaaggaact gattacaaac attggccgca aattgcacaa 29040
 tttgctccaa gtgcctctgc attctttgga atgtcacgca ttggcatgga agtcacacct 29100
 tcgggaacat ggctgactta tcatggagcc attaaattgg atgacaaaga tccacaattc 29160
 30 aaagacaacg tcatactgct gaacaagcac attgacgcat acaaacatt cccaccaaca 29220
 gagcctaaaa aggacaaaaa gaaaaagact gatgaagctc agcctttgcc gcagagacaa 29280
 aagaagcagc ccaactgtgac tcttcttctc gcggctgaca tggatgattt ctccagacaa 29340
 35 cttcaaaatt ccatgagtgg agcttctgct gattcaactc aggcataaac actcatgatg 29400
 accacacaag gcagatgggc tatgtaaacg ttttcgcaat tccgtttacg atacatagtc 29460
 tactcttgtg cagaatgaat tctcgttaact aaacagcaca agtaggttta gttaacttta 29520
 40 atctcacata gcaatcttta atcaatgtgt aacattaggg aggacttgaa agagccacca 29580
 cttttcattc gaggccacgc ggagtacgat cgagggtaca gtgaataatg ctagggagag 29640
 ctgcctatat ggaagagccc taatgtgtaa aattaatttt agtagtgcta tccccatgtg 29700
 45 attttaatat cttcttagga gaatgacaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 29746

<210> 2
 <211> 3945
 <212> DNA
 50 <213> CORONAVIRUS

<220>
 <221> CDS
 <222> (89)..(3853)
 55 <223>

<400> 2

EP 1 694 829 B1

	ttctcttctg gaaaaaggta ggcttatcat tagagaaaac aacagagttg tggtttcaag	60
	tgatattctt gttaacaact aaacgaac atg ttt att ttc tta tta ttt ctt	112
5	Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu 1 5	
	act ctc act agt ggt agt gac ctt gac cgg tgc acc act ttt gat gat	160
	Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp	
	10 gtt caa gct cct aat tac act caa cat act tca tct atg agg ggg gtt	208
	Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val	
	25 25 30 35 40	
	tac tat cct gat gaa att ttt aga tca gac act ctt tat tta act cag	256
15	Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln	
	45 50 55	
	gat tta ttt ctt cca ttt tat tct aat gtt aca ggg ttt cat act att	304
	Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile	
	60 65 70	
20	aat cat acg ttt ggc aac cct gtc ata cct ttt aag gat ggt att tat	352
	Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr	
	75 80 85	
	ttt gct gcc aca gag aaa tca aat gtt gtc cgt ggt tgg gtt ttt ggt	400
25	Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly	
	90 95 100	
	tct acc atg aac aac aag tca cag tgc gtt gtc att att att aac aat tct	448
	Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser	
	105 110 115 120	
30	act aat gtt gtt ata cga gca tgt aac ttt gaa ttg tgt gac aac cct	496
	Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro	
	125 130 135	
	ttc ttt gct gtt tct aaa ccc atg ggt aca cag aca cat act atg ata	544
35	Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile	
	140 145 150	
	ttc gat aat gca ttt aat tgc act ttc gag tac ata tct gat gcc ttt	592
	Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe	
	155 160 165	
40	tcg ctt gat gtt tca gaa aag tca ggt aat ttt aaa cac tta cga gag	640
	Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu	
	170 175 180	
	ttt gtg ttt aaa aat aaa gat ggg ttt ctc tat gtt tat aag ggc tat	688
45	Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr	
	185 190 195 200	
	caa cct ata gat gta gtt cgt gat cta cct tct ggt ttt aac act ttg	736
	Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu	
	205 210 215	
50	aaa cct att ttt aag ttg cct ctt ggt att aac att aca aat ttt aga	784

55

EP 1 694 829 B1

	Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Ile	Asn	Ile	Thr	Asn	Phe	Arg	
				220					225					230			
5	gcc	att	ctt	aca	gcc	ttt	tca	cct	gct	caa	gac	att	tgg	ggc	acg	tca	832
	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Gln	Asp	Ile	Trp	Gly	Thr	Ser	
			235					240					245				
10	gct	gca	gcc	tat	ttt	ggt	ggc	tat	tta	aag	cca	act	aca	ttt	atg	ctc	880
	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Val	Gly	Tyr	Leu	Lys	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Leu	
		250					255					260					
15	aag	tat	gat	gaa	aat	ggt	aca	atc	aca	gat	gct	ggt	gat	tgt	tct	caa	928
	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Gln	
	265					270					275					280	
20	aat	cca	ctt	gct	gaa	ctc	aaa	tgc	tct	ggt	aag	agc	ttt	gag	att	gac	976
	Asn	Pro	Leu	Ala	Glu	Leu	Lys	Cys	Ser	Val	Lys	Ser	Phe	Glu	Ile	Asp	
					285					290					295		
25	aaa	gga	att	tac	cag	acc	tct	aat	ttc	agg	ggt	ggt	ccc	tca	gga	gat	1024
	Lys	Gly	Ile	Tyr	Gln	Thr	Ser	Asn	Phe	Arg	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Asp	
				300					305					310			
30	ggt	gtg	aga	ttc	cct	aat	att	aca	aac	ttg	tgt	cct	ttt	gga	gag	ggt	1072
	Val	Val	Arg	Phe	Pro	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro	Phe	Gly	Glu	Val	
			315					320					325				
35	ttt	aat	gct	act	aaa	ttc	cct	tct	gtc	tat	gca	tgg	gag	aga	aaa	aaa	1120
	Phe	Asn	Ala	Thr	Lys	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Ala	Trp	Glu	Arg	Lys	Lys	
		330					335					340					
40	att	tct	aat	tgt	ggt	gct	gat	tac	tct	gtg	ctc	tac	aac	tca	aca	ttt	1168
	Ile	Ser	Asn	Cys	Val	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	
	345					350					355					360	
45	ttt	tca	acc	ttt	aag	tgc	tat	ggc	ggt	tct	gcc	act	aag	ttg	aat	gat	1216
	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys	Cys	Tyr	Gly	Val	Ser	Ala	Thr	Lys	Leu	Asn	Asp	
					365					370					375		
50	ctt	tgc	ttc	tcc	aat	gtc	tat	gca	gat	tct	ttt	gta	gtc	aag	gga	gat	1264
	Leu	Cys	Phe	Ser	Asn	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Val	Val	Lys	Gly	Asp	
				380					385					390			
55	gat	gta	aga	caa	ata	gcg	cca	gga	caa	act	ggt	ggt	att	gct	gat	tat	1312
	Asp	Val	Arg	Gln	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Tyr	
			395					400					405				
60	aat	tat	aaa	ttg	cca	gat	gat	ttc	atg	ggt	tgt	gtc	ctt	gct	tgg	aat	1360
	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Met	Gly	Cys	Val	Leu	Ala	Trp	Asn	
		410				415						420					
65	act	agg	aac	att	gat	gct	act	tca	act	ggt	aat	tat	aat	tat	aaa	tat	1408
	Thr	Arg	Asn	Ile	Asp	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Tyr	
	425					430					435					440	
70	agg	tat	ctt	aga	cat	ggc	aag	ctt	agg	ccc	ttt	gag	aga	gac	ata	tct	1456
	Arg	Tyr	Leu	Arg	His	Gly	Lys	Leu	Arg	Pro	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Ser	
					445					450					455		
75	aat	gtg	cct	ttc	tcc	cct	gat	ggc	aaa	cct	tgc	acc	cca	cct	gct	ctt	1504
	Asn	Val	Pro	Phe	Ser	Pro	Asp	Gly	Lys	Pro	Cys	Thr	Pro	Pro	Ala	Leu	
				460					465					470			
80	aat	tgt	tat	tgg	cca	tta	aat	gat	tat	ggt	ttt	tac	acc	act	act	ggc	1552
	Asn	Cys	Tyr	Trp	Pro	Leu	Asn	Asp	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Thr	Thr	Gly	
			475					480					485				
85	att	ggc	tac	caa	cct	tac	aga	ggt	gta	gta	ctt	tct	ttt	gaa	ctt	tta	1600

EP 1 694 829 B1

	Ile	Gly	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Arg	Val	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Leu	
		490					495					500					
5	aat	gca	ccg	gcc	acg	ggt	tgt	gga	cca	aaa	tta	tcc	act	gac	ctt	att	1648
	Asn	Ala	Pro	Ala	Thr	Val	Cys	Gly	Pro	Lys	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Ile	
	505					510					515				520		
	aag	aac	cag	tgt	gtc	aat	ttt	aat	ttt	aat	gga	ctc	act	ggt	act	ggt	1696
	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Asn	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Gly	
					525					530				535			
10	gtg	tta	act	cct	tct	tca	aag	aga	ttt	caa	cca	ttt	caa	caa	ttt	ggc	1744
	Val	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Arg	Phe	Gln	Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Gly	
				540					545					550			
15	cgt	gat	ggt	tct	gat	ttc	act	gat	tcc	ggt	cga	gat	cct	aaa	aca	tct	1792
	Arg	Asp	Val	Ser	Asp	Phe	Thr	Asp	Ser	Val	Arg	Asp	Pro	Lys	Thr	Ser	
			555					560					565				
	gaa	ata	tta	gac	att	tca	cct	tgc	tct	ttt	ggg	ggt	gta	agt	gta	att	1840
	Glu	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Pro	Cys	Ser	Phe	Gly	Gly	Val	Ser	Val	Ile	
		570					575					580					
20	aca	cct	gga	aca	aat	gct	tca	tct	gaa	ggt	gct	ggt	cta	tat	caa	gat	1888
	Thr	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Tyr	Gln	Asp	
	585					590					595					600	
25	ggt	aac	tgc	act	gat	ggt	tct	aca	gca	att	cat	gca	gat	caa	ctc	aca	1936
	Val	Asn	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	His	Ala	Asp	Gln	Leu	Thr	
					605					610					615		
	cca	gct	tgg	cgc	ata	tat	tct	act	gga	aac	aat	gta	ttc	cag	act	caa	1984
	Pro	Ala	Trp	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Gly	Asn	Asn	Val	Phe	Gln	Thr	Gln	
				620					625					630			
30	gca	ggc	tgt	ctt	ata	gga	gct	gag	cat	gtc	gac	act	tct	tat	gag	tgc	2032
	Ala	Gly	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Glu	His	Val	Asp	Thr	Ser	Tyr	Glu	Cys	
			635					640					645				
35	gac	att	cct	att	gga	gct	ggc	att	tgt	gct	agt	tac	cat	aca	ggt	tct	2080
	Asp	Ile	Pro	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Ala	Ser	Tyr	His	Thr	Val	Ser	
		650					655					660					
	tta	tta	cg	agt	act	agc	caa	aaa	tct	att	gtg	gct	tat	act	atg	tct	2128
	Leu	Leu	Arg	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Ser	Ile	Val	Ala	Tyr	Thr	Met	Ser	
	665					670					675					680	
40	tta	ggt	gct	gat	agt	tca	att	gct	tac	tct	aat	aac	acc	att	gct	ata	2176
	Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile	Ala	Tyr	Ser	Asn	Asn	Thr	Ile	Ala	Ile	
					685					690					695		
45	cct	act	aac	ttt	tca	att	agc	att	act	aca	gaa	gta	atg	cct	ggt	tct	2224
	Pro	Thr	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Ile	Thr	Thr	Glu	Val	Met	Pro	Val	Ser	
				700					705					710			
	atg	gct	aaa	acc	tcc	gta	gat	tgt	aat	atg	tac	atc	tgc	gga	gat	tct	2272
	Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Val	Asp	Cys	Asn	Met	Tyr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	
			715					720					725				
50	act	gaa	tgt	gct	aat	ttg	ctt	ctc	caa	tat	ggt	agc	ttt	tgc	aca	caa	2320
	Thr	Glu	Cys	Ala	Asn	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Gln	
		730					735					740					
55	cta	aat	cg	gca	ctc	tca	gg	att	gct	gct	gaa	cag	gat	cg	aac	aca	2368
	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Arg	Asn	Thr	
	745					750					755					760	
	cgt	gaa	gtg	ttc	gct	caa	gtc	aaa	caa	atg	tac	aaa	acc	cca	act	ttg	2416

EP 1 694 829 B1

	Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Gln	Val	Lys	Gln	Met	Tyr	Lys	Thr	Pro	Thr	Leu	
					765					770					775		
5	aaa	tat	ttt	ggt	ggt	ttt	aat	ttt	tca	caa	ata	tta	cct	gac	cct	cta	2464
	Lys	Tyr	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Phe	Ser	Gln	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	
				780					785					790			
	aag	cca	act	aag	agg	tct	ttt	att	gag	gac	ttg	ctc	ttt	aat	aag	gtg	2512
	Lys	Pro	Thr	Lys	Arg	Ser	Phe	Ile	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Val	
			795					800					805				
10	aca	ctc	gct	gat	gct	ggc	ttc	atg	aag	caa	tat	ggc	gaa	tgc	cta	ggt	2560
	Thr	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Phe	Met	Lys	Gln	Tyr	Gly	Glu	Cys	Leu	Gly	
		810				815						820					
15	gat	att	aat	gct	aga	gat	ctc	att	tgt	gcg	cag	aag	ttc	aat	gga	ctt	2608
	Asp	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Leu	Ile	Cys	Ala	Gln	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu	
	825					830					835					840	
	aca	gtg	ttg	cca	cct	ctg	ctc	act	gat	gat	atg	att	gct	gcc	tac	act	2656
	Thr	Val	Leu	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Thr	
					845					850					855		
20	gct	gct	cta	ggt	agt	ggg	act	gcc	act	gct	gga	tgg	aca	ttt	ggt	gct	2704
	Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Trp	Thr	Phe	Gly	Ala	
				860					865					870			
25	ggc	gct	gct	ctt	caa	ata	cct	ttt	gct	atg	caa	atg	gca	tat	agg	ttc	2752
	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Pro	Phe	Ala	Met	Gln	Met	Ala	Tyr	Arg	Phe	
			875					880					885				
	aat	ggc	att	gga	ggt	acc	caa	aat	ggt	ctc	tat	gag	aac	caa	aaa	caa	2800
	Asn	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Lys	Gln	
		890					895					900					
30	atc	gcc	aac	caa	ttt	aac	aag	gcg	att	agt	caa	att	caa	gaa	tca	ctt	2848
	Ile	Ala	Asn	Gln	Phe	Asn	Lys	Ala	Ile	Ser	Gln	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	
	905				910						915					920	
	aca	aca	aca	tca	act	gca	ttg	ggc	aag	ctg	caa	gac	ggt	ggt	aac	cag	2896
	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	Val	Asn	Gln	
					925					930					935		
35	aat	gct	caa	gca	tta	aac	aca	ctt	ggt	aaa	caa	ctt	agc	tct	aat	ttt	2944
	Asn	Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	Ser	Ser	Asn	Phe	
				940					945					950			
40	ggt	gca	att	tca	agt	gtg	cta	aat	gat	atc	ctt	tcg	cga	ctt	gat	aaa	2992
	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Ser	Arg	Leu	Asp	Lys	
			955					960					965				
45	gtc	gag	gcg	gag	gta	caa	att	gac	agg	tta	att	aca	ggc	aga	ctt	caa	3040
	Val	Glu	Ala	Glu	Val	Gln	Ile	Asp	Arg	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Leu	Gln	
		970					975					980					
	agc	ctt	caa	acc	tat	gta	aca	caa	caa	cta	atc	agg	gct	gct	gaa	atc	3088
	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Val	Thr	Gln	Gln	Leu	Ile	Arg	Ala	Ala	Glu	Ile	
	985					990					995					1000	
50	agg	gct	tct	gct	aat	ctt	gct	gct	act	aaa	atg	tct	gag	tgt	ggt		3133
	Arg	Ala	Ser	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Lys	Met	Ser	Glu	Cys	Val		
					1005					1010					1015		
	ctt	gga	caa	tca	aaa	aga	ggt	gac	ttt	tgt	gga	aag	ggc	tac	cac		3178
	Leu	Gly	Gln	Ser	Lys	Arg	Val	Asp	Phe	Cys	Gly	Lys	Gly	Tyr	His		
					1020					1025					1030		
55	ctt	atg	tcc	ttc	cca	caa	gca	gcc	ccg	cat	ggt	ggt	gtc	ttc	cta		3223

EP 1 694 829 B1

	Leu	Met	Ser	Phe	Pro	Gln	Ala	Ala	Pro	His	Gly	Val	Val	Phe	Leu	
					1035					1040					1045	
5	cat	gtc	acg	tat	gtg	cca	tcc	cag	gag	agg	aac	ttc	acc	aca	gcg	3268
	His	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Ser	Gln	Glu	Arg	Asn	Phe	Thr	Thr	Ala	
					1050					1055					1060	
10	cca	gca	att	tgt	cat	gaa	ggc	aaa	gca	tac	ttc	cct	cgt	gaa	ggc	3313
	Pro	Ala	Ile	Cys	His	Glu	Gly	Lys	Ala	Tyr	Phe	Pro	Arg	Glu	Gly	
					1065					1070					1075	
15	gtt	ttt	gtg	ttt	aat	ggc	act	tct	tgg	ttt	att	aca	cag	agg	aac	3358
	Val	Phe	Val	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser	Trp	Phe	Ile	Thr	Gln	Arg	Asn	
					1080					1085					1090	
20	ttc	ttt	tct	cca	caa	ata	att	act	aca	gac	aat	aca	ttt	gtc	tca	3403
	Phe	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Thr	Thr	Asp	Asn	Thr	Phe	Val	Ser	
					1095					1100					1105	
25	gga	aat	tgt	gat	gtc	ggt	att	ggc	atc	att	aac	aac	aca	ggt	tat	3448
	Gly	Asn	Cys	Asp	Val	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Tyr	
					1110					1115					1120	
30	gat	cct	ctg	caa	cct	gag	ctt	gac	tca	ttc	aaa	gaa	gag	ctg	gac	3493
	Asp	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Leu	Asp	Ser	Phe	Lys	Glu	Glu	Leu	Asp	
					1125					1130					1135	
35	aag	tac	ttc	aaa	aat	cat	aca	tca	cca	gat	ggt	gat	ctt	ggc	gac	3538
	Lys	Tyr	Phe	Lys	Asn	His	Thr	Ser	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Asp	
					1140					1145					1150	
40	att	tca	ggc	att	aac	gct	tct	gtc	gtc	aac	att	caa	aaa	gaa	att	3583
	Ile	Ser	Gly	Ile	Asn	Ala	Ser	Val	Val	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu	Ile	
					1155					1160					1165	
45	gac	cgc	ctc	aat	gag	gtc	gct	aaa	aat	tta	aat	gaa	tca	ctc	att	3628
	Asp	Arg	Leu	Asn	Glu	Val	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	
					1170					1175					1180	
50	gac	ctt	caa	gaa	ttg	gga	aaa	tat	gag	caa	tat	att	aaa	tgg	cct	3673
	Asp	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Ile	Lys	Trp	Pro	
					1185					1190					1195	
55	tgg	tat	ggt	tgg	ctc	ggc	ttc	att	gct	gga	cta	att	gcc	atc	gtc	3718
	Trp	Tyr	Val	Trp	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Gly	Leu	Ile	Ala	Ile	Val	
					1200					1205					1210	
60	atg	ggt	aca	atc	ttg	ctt	tgt	tgc	atg	act	agt	tgt	tgc	agt	tgc	3763
	Met	Val	Thr	Ile	Leu	Leu	Cys	Cys	Met	Thr	Ser	Cys	Cys	Ser	Cys	
					1215					1220					1225	
65	ctc	aag	ggc	gca	tgc	tct	tgt	ggt	tct	tgc	tgc	aag	ttt	gat	gag	3808
	Leu	Lys	Gly	Ala	Cys	Ser	Cys	Gly	Ser	Cys	Cys	Lys	Phe	Asp	Glu	
					1230					1235					1240	
70	gat	gac	tct	gag	cca	ggt	ctc	aag	ggt	gtc	aaa	tta	cat	tac	aca	3853
	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	His	Tyr	Thr	
					1245					1250					1255	
75	taaacgaact tatggatttg tttatgagat tttttactct tggatcaatt actgcacagc															3913
80	cagtaaaaat tgacaatgct tctcctgcaa gt															3945

<210> 3
<211> 1255

EP 1 694 829 B1

<212> PRT
 <213> CORONAVIRUS

<400> 3

5
 Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
 1 5 10 15

10
 Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
 20 25 30

15
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
 35 40 45

20
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
 50 55 60

25
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
 65 70 75 80

30
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
 85 90 95

35
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln
 100 105 110

40
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys
 115 120 125

45
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met
 130 135 140

50
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160

55
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
 165 170 175

60
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
 180 185 190

65
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
 195 200 205

70
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu
 210 215 220

75
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
 225 230 235 240

EP 1 694 829 B1

Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
245 250 255

5 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
260 265 270

10 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
275 280 285

15 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
290 295 300

20 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
305 310 315 320

25 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
325 330 335

30 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
340 345 350

35 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
355 360 365

40 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
370 375 380

45 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
385 390 395 400

50 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
405 410 415

55 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser
420 425 430

Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
435 440 445

Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
450 455 460

Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
465 470 475 480

Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
485 490 495

55 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
500 505 510

EP 1 694 829 B1

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn
 515 520 525
 5 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg
 530 535 540
 10 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp
 545 550 555 560
 15 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys
 565 570 575
 20 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr
 595 600 605
 25 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr
 610 615 620
 30 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu
 625 630 635 640
 35 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile
 645 650 655
 40 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys
 660 665 670
 45 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
 675 680 685
 50 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
 690 695 700
 55 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys
 705 710 715 720
 60 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
 725 730 735
 65 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
 740 745 750
 70 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys
 755 760 765
 75 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe
 770 775 780

EP 1 694 829 B1

Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile
 785 790 795 800
 5
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
 805 810 815
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
 820 825 830
 10
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr
 835 840 845
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
 850 855 860
 15
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
 865 870 875 880
 20
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
 885 890 895
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala
 900 905 910
 25
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly
 915 920 925
 30
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu
 930 935 940
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn
 945 950 955 960
 35
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp
 965 970 975
 40
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln
 980 985 990
 45
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala
 995 1000 1005
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp
 1010 1015 1020
 50
 Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala
 1025 1030 1035
 55
 Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln
 1040 1045 1050

EP 1 694 829 B1

5
 Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys
 1055 1060 1065
 5
 Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser
 1070 1075 1080
 10
 Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr
 1085 1090 1095
 15
 Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly
 1100 1105 1110
 15
 Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp
 1115 1120 1125
 20
 Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser
 1130 1135 1140
 25
 Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val
 1145 1150 1155
 25
 Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys
 1160 1165 1170
 30
 Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr
 1175 1180 1185
 35
 Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile
 1190 1195 1200
 35
 Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys
 1205 1210 1215
 40
 Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly
 1220 1225 1230
 45
 Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys
 1235 1240 1245
 45
 Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 1250 1255

50 <210> 4
 <211> 3943
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

55 <400> 4

EP 1 694 829 B1

ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta gagaaaaca cagagttgtg gtttcaagtg 60

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 694 829 B1

atattcttgt taacaactaa acgaacatgt ttattttctt attatttctt actctcacta 120
 gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc 180
 5 aacatacttc atctatgagg ggggtttact atcctgatga aatttttaga tcagacactc 240
 tttatttaac tcaggattta tttcttccat tttattctaa tgttacaggg tttcatacta 300
 ttaatcatac gtttggaac cctgtcatac cttttaagga tggattttat tttgctgcca 360
 10 cagagaaatc aaatgttgtc cgtgggtggg tttttggttc taccatgaac aacaagtcac 420
 agtcggtgat tattattaac aatttacta atggtgttat acgagcatgt aactttgaat 480
 tgtgtgacaa ccctttcttt gctgtttcta aacccatggg tacacagaca catactatga 540
 15 tattcgataa tgcatttaat tgcactttcg agtacatatac tgatgccttt tcgcttgatg 600
 tttcagaaaa gtcaggtaat tttaaact tacgagagtt tgtgtttaa aataaagatg 660
 ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac ctatagatgt agttcgtgat ctaccttctg 720
 20 gttttaacac tttgaaacct atttttaagt tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta 780
 gagccattct tacagccttt tcacctgctc aagacatttg gggcacgtca gctgcagcct 840
 attttgttgg ctatttaaag ccaactacat ttatgctcaa gtatgatgaa aatggtacaa 900
 25 tcacagatgc tgttgattgt tctcaaatc cacttgctga actcaaatgc tctgttaaga 960
 gctttgagat tgacaaagga atttaccaga cctctaattt cagggttgtt ccctcaggag 1020
 atgttgtagag attccctaatt attacaaact tgtgtccttt tggagaggtt tttaatgcta 1080
 30 ctaaattccc ttctgtctat gcatgggaga gaaaaaaaaat ttctaattgt gttgctgatt 1140
 actctgtgct ctacaactca acatTTTTTT caacctttaa gtgctatggc gtttctgcca 1200
 ctaagttgaa tgatctttgc ttctccaatg tctatgcaga ttcttttgta gtcaagggag 1260
 35 atgatgtaag acaaatagcg ccaggacaaa ctgggtgttat tgctgattat aattataaat 1320
 tgccagatga tttcatgggt tgtgtccttg cttggaatac taggaacatt gatgctactt 1380
 caactggtaa ttataattat aaatataggt atcttagaca tggcaagctt aggccctttg 1440
 40 agagagacat atctaattgt cctttctccc ctgatggcaa acctgcacc ccacctgctc 1500
 ttaattgtta ttggccatta aatgattatg gtttttacac cactactggc attggctacc 1560
 aaccttacag agttgtagta ctttcttttg aacttttaa tgcaccggcc acggtttgtg 1620
 45 gacaaaatt atccactgac cttattaaga accagtgtgt caattttaat tttaatggac 1680
 tcaactggtac tgggtgtgta actccttctt caaagagatt tcaaccattt caacaatttg 1740
 gccgtgatgt ctctgatttc actgattccg ttcgagatcc taaaacatct gaaatattag 1800
 50 acatttcacc ttgctctttt gggggtgtaa gtgtaattac acctggaaca aatgcttcat 1860
 ctgaagttgc tgttctatat caagatgtta actgcactga tgtttctaca gcaatccatg 1920
 cagatcaact cacaccagct tggcgcatac atttctactgg aaacaatgta ttccagactc 1980
 55 aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg tcgacacttc ttatgagtgac gacattccta 2040
 ttggagctgg catttgtgct agttaceata cagtttcttt attacgtagt actagcmeta 2100

EP 1 694 829 B1

aatctattgt ggcttatact atgtctttag gtgctgatag ttcaattgct tactctaata 2160
acaccattgc tatacctact aacttttcaa ttagcattac tacagaagta atgcctgttt 2220
5 ctatggctaa aacctccgta gattgtaata tgtacatctg cggagattct actgaatgtg 2280
ctaatttgct tctccaatat ggtagctttt gcacacaact aaatcgtgca ctctcaggta 2340
ttgctgctga acaggatcgc aacacacgtg aagtgttcgc tcaagtcaaa caaatgtaca 2400
10 aaacccaac tttgaaatat tttggtggtt ttaatttttc acaaatatta cctgaccctc 2460
taaagccaac taagaggtct tttattgagg acttgctctt taataagggtg aactcgtctg 2520
atgctggctt catgaagcaa tatggcgaat gcctagggtga tattaatgct agagatctca 2580
15 tttgtgcgca gaagttcaat gggcttacag tgttgccacc tctgctcact gatgatatga 2640
ttgctgccta cactgctgct ctagttagtg gtactgccac tgctggatgg acatttggtg 2700
ctggcgctgc tcttcaaata ctttttgcta tgcaaatggc atatagggtc aatggcattg 2760
20 gagttacca aatgttctc tatgagaacc aaaaacaaat cgccaaccaa ttaacaagg 2820
cgattagtca aattcaagaa tcacttacia caacatcaac tgcattgggc aagctgcaag 2880
acgttgtaa ccagaatgct caagcattaa acacacttgt taaacaactt agctctaatt 2940
25 ttggtgcaat ttcaagtgtg ctaaatagata tcctttcgcg acttgataaa gtcgaggcgg 3000
aggtacaaat tgacaggcta attacaggca gacttcaaag cttcaaacc tatgtaacac 3060
aacaactaat cagggctgct gaaatcaggg cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt 3120
30 ctgagtgtgt tcttgacaa tcaaaaagag ttgacttttg tggaaagggc taccacctta 3180
tgtccttccc acaagcagcc ccgcatggtg ttgtcttctt acatgtcacg tatgtgccat 3240
cccaggagag gaacttcacc acagcgcag caatttgca tgaaggcaaa gcatacttcc 3300
35 ctcgtgaagg tgtttttgtg tttaatggca cttcttggtt tattacacag aggaacttct 3360
tttctccaca aataattact acagacaata catttgctc aggaaattgt gatgtcgta 3420
ttggcatcat taacaacaca gtttatgatc ctctgcaacc tgagcttgac tcattcaaag 3480
40 aagagctgga caagtacttc aaaaatcata catcaccaga tgttgatctt ggcgacattt 3540
caggcattaa cgcttctgtc gtcaacattc aaaaagaaat tgaccgcctc aatgaggtcg 3600
ctaaaaattt aatgaatca ctcattgacc ttcaagaatt gggaaaatat gagcaatata 3660
45 ttaaattggc ttggtatggt tggctcggct tcattgctgg actaattgcc atcgatcatgg 3720
ttacaatctt gctttgttgc atgactagtt gttgcagttg cctcaagggt gcatgctctt 3780
gtggttcttg ctgcaagttt gatgaggatg actctgagcc agttctcaag ggtgtcaaat 3840
50 tacattacac ataaacgaac ttatggattt gtttatgaga ttttttactc ttggatcaat 3900
tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc ttctcctgca agt 3943

55 <210> 5
<211> 2049
<212> DNA
<213> CORONAVIRUS

EP 1 694 829 B1

<400> 5

	ctcttctgga	aaaaggtagg	cttatcatta	gagaaaacaa	cagagttgtg	gtttcaagtg	60
5	atattcttgt	taacaactaa	acgaacatgt	ttattttctt	attatttctt	actctcacta	120
	gtggtagtga	ccttgaccgg	tgcaccactt	ttgatgatgt	tcaagctcct	aattacactc	180
	aacatacttc	atctatgagg	ggggtttact	atcctgatga	aattttttaga	tcagacactc	240
10	tttatttaac	tcaggattta	tttcttccat	tttattctaa	tgttacaggg	tttcatacta	300
	ttaatcatac	gtttggcaac	cctgtcatac	cttttaagga	tggtatttat	tttgctgcca	360
	cagagaaatc	aaatgttgtc	cgtggttggg	tttttggtc	taccatgaac	aacaagtcac	420
15	agtcggtgat	tattattaac	aattctacta	atgttgttat	acgagcatgt	aactttgaat	480
	tgtgtgacaa	ccctttcttt	gctgtttcta	aacccatggg	tacacagaca	catactatga	540
	tattcgataa	tgcatttaat	tgcactttcg	agtacatatac	tgatgccttt	tcgcttgatg	600
20	tttcagaaaa	gtcaggtaat	tttaaacact	tacgagagtt	tgtgtttaa	aataaagatg	660
	ggtttctcta	tgtttataag	ggctatcaac	ctatagatgt	agttcgtgat	ctaccttctg	720
	gttttaacac	tttgaaacct	atttttaagt	tgctcttgg	tattaacatt	acaaatttta	780
25	gagccattct	tacagccttt	tcacctgctc	aagacatttg	gggcacgtca	gctgcagcct	840
	attttgttgg	ctatttaaag	ccaactacat	ttatgctcaa	gtatgatgaa	aatggtacaa	900
	tcacagatgc	tgttgattgt	tctcaaaatc	cacttgctga	actcaaatgc	tctgttaaga	960
30	gctttgagat	tgacaaagga	atttaccaga	cctctaattt	cagggttggt	ccctcaggag	1020
	atgttgtgag	attccctaata	attacaaact	tgtgtccttt	tggagagggt	tttaatgcta	1080
	ctaaattccc	ttctgtctat	gcatgggaga	gaaaaaaaaat	ttctaattgt	gttgctgatt	1140
35	actctgtgct	ctacaactca	acatTTTTTT	caacctttaa	gtgctatggc	gtttctgcca	1200
	ctaagttgaa	tgatctttgc	ttctccaatg	tctatgcaga	ttcttttgta	gtcaagggag	1260
	atgatgtaag	acaaatagcg	ccaggacaaa	ctggtgttat	tgctgattat	aattataaat	1320
40	tgccagatga	tttcatgggt	tgtgtccttg	cttggatac	taggaacatt	gatgctactt	1380
	caactggtaa	ttataattat	aatataggt	atcttagaca	tggcaagctt	aggccctttg	1440
	agagagacat	atctaagtgt	cctttctccc	ctgatggcaa	accttgcacc	ccacctgctc	1500
45	ttaattgtta	ttggccatta	aatgattatg	gtttttacac	cactactggc	attggctacc	1560
	aaccttacag	agttgtagta	ctttcttttg	aacttttaaa	tgcaccggcc	acggtttgtg	1620
	gaccaaatt	atccactgac	cttattaaga	accagtgtgt	caattttaat	tttaatggac	1680
50	tcactggtac	tggtgtgtta	actccttctt	caaagagatt	tcaaccattt	caacaatttg	1740
	gccgtgatgt	ctctgatttc	actgattccg	ttcgagatcc	taaaacatct	gaaatattag	1800
55	acatttcacc	ttgctctttt	gggggtgtaa	gtgtaattac	acctggaaca	aatgcttcat	1860

EP 1 694 829 B1

	ctgaagttgc tgttctatat caagatgtta actgcactga tgtttctaca gcaatccatg	1920
	cagatcaact cacaccagct tggcgcatat attctactgg aaacaatgta ttccagactc	1980
5	aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg tgcgacttc ttatgagtgc gacattccta	2040
	ttggagctg	2049
10	<210> 6 <211> 2027 <212> DNA <213> CORONAVIRUS	
15	<400> 6	
	catgcagatc aactcacacc agcttggcgc atatattcta ctggaaacaa tgtattccag	60
20	actcaagcag gctgtcttat aggagctgag catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt	120
	cctattggag ctggcatttg tgctagttac catacagttt ctttattacg tagtactagc	180
	caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct	240
25	aataacacca ttgctatacc tactaacttt tcaattagca ttactacaga agtaatgcct	300
	gtttctatgg ctaaaacctc cgtagattgt aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa	360
	tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc ttttgcacac aactaaatcg tgcaactctca	420
30	ggatttgctg ctgaacagga tcgcaacaca cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaatg	480
	tacaaaacc caactttgaa atattttggt ggttttaatt tttcacaat attacctgac	540
	cctctaaagc caactaagag gtcttttatt gaggacttgc tctttaataa ggtgactctc	600
35	gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat	660
	ctcatttgctg cgcagaagtt caatgggctt acagtgttgc cacctctgct cactgatgat	720
	atgattgctg cctacactgc tgctctagtt agtggtagct ccactgctgg atggacattt	780
40	ggtgctggcg ctgctcttca aatacctttt gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc	840
	attggagtta cccaaaatgt tctctatgag aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac	900
	aaggcgatta gtcaaattca agaatcactt acaacaacat caactgcatt gggcaagctg	960
45	caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca ttaaacacac ttgttaaca acttagctct	1020
	aattttggtg caatttcaag tgtgctaaat gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag	1080
	gcggagggtac aaattgacag gttaattaca ggcagacttc aaagccttca aacctatgta	1140
50	acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa	1200
	atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa agagttgact tttgtggaaa gggctaccac	1260
	cttatgtcct tcccacaagc agccccgcat ggtgttgtct tcctacatgt cacgtatgtg	1320
55	ccatcccagg agaggaactt caccacagcg ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac	1380
	ttccctcgtg aagggtgttt tgtgtttaat ggcacttctt ggtttattac acagaggaac	1440

EP 1 694 829 B1

	ttcttttctc cacaataat tactacagac aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc	1500
	gttattggcg tcattaacaa cacagtttat gatcctctgc aacctgagct tgactcattc	1560
5	aaagaagagc tggacaagta cttcaaaaat catacatcac cagatgttga tcttggcgac	1620
	atctcaggca ttaacgcttc tgctgtcaac attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag	1680
	gtcgcataaaa atttaaatga atcactcatt gaccttcaag aattgggaaa atatgagcaa	1740
10	tatattaaat ggccttggta tgtttggctc ggcttcattg ctggactaat tgccatcgtc	1800
	atggttacaa tcttgctttg ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa ggggtgatgc	1860
	tcttgtgggt cttgctgcaa gtttcatgag gatgactctg agccagttct caaggggtgc	1920
15	aaattacatt acacataaac gaacttatgg atttgtttat gagatTTTTT actcttggat	1980
	caattactgc acagccagta aaaattgaca atgcttctcc tgcaagt	2027
20	<210> 7	
	<211> 1096	
	<212> DNA	
	<213> CORONAVIRUS	
25	<400> 7	
	tcttgccttg ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa ggggtgatgc tcttgtgggt	60
	cttgcctgcaa gtttcatgag gatgactctg agccagttct caaggggtgc aaattacatt	120
30	acacataaac gaacttatgg atttgtttat gagatTTTTT actcttggat caattactgc	180
	acagccagta aaaattgaca atgcttctcc tgcaagtact gttcatgcta cagcaacgat	240
	accgctacaa gcctcactcc ctttcggatg gcttgttatt ggcggtgcat ttcttgcctg	300
35	ttttcagagc gctaccaaaa taattgctgct caataaaaga tggcagctag ccctttataa	360
	gggcttccag ttcatttgca atttactgct gctatttgtt accatctatt cacatctttt	420
	gcttgtcgtc gcaggtatgg aggcgcaatt tttgtacctc tatgccttga tatattttct	480
40	acaatgcatc aacgcatgta gaattattat gagatgttgg ctttgttggga agtgcaaatc	540
	caagaacca ttactttatg atgccaacta ctttgtttgc tggcacacac ataactatga	600
	ctactgtata ccatataaca gtgtcacaga tacaattgct gttactgaag gtgacggcat	660
45	ttcaacacca aaactcaaag aagactacca aattgggtgt tattctgagg ataggcactc	720
	agggtgttaaa gactatgctg ttgtacatgg ctatttcacc gaagtttact accagcttga	780
	gtctacacaa attactacag aactgggtat tgaaaatgct acattcttca tctttaacaa	840
50	gcttgttaaa gaccaccga atgtgcaaat acacacaatc gacggctctt caggagtgc	900
	taatccagca atggatccaa tttatgatga gccgacgacg actactagcg tgcccttgta	960
	agcacaagaa agtgagtacg aacttatgta ctattcgtt tcggaagaaa caggtacgtt	1020
55	aatagttaat agcgtacttc ttttcttgc tttcgtggta ttcttgctag tcacactagc	1080

catccttact gcgctt

1096

5 <210> 8
 <211> 1135
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

10 <400> 8

attgccatcg tcatggttac aatccttgctt tgttgcataga ctagttggtg cagttgcctc 60
 aagggtgcat gctccttggtg ttcttgctgc aagtttgatg aggatgactc tgagccagtt 120
 15 ctcaaggggtg tcaaattaca ttacacataa acgaacttat ggatttgttt atgagatttt 180
 ttactccttg atcaattact gcacagccag taaaaattga caatgcttct cctgcaagta 240
 ctgttcatgc tacagcaacg ataccgctac aagcctcact ccctttcgga tggccttgta 300
 20 ttggcgttgc atttccttgct gttttcaga gcgctaccaa aataattgcg ctcaataaaa 360
 gatggcagct agccctttat aagggttcc agttcatttg caatttactg ctgctatttg 420
 ttaccatcta ttcacatctt ttgcttgctg ctgcaggtat ggaggcgcaa tttttgtacc 480
 25 tctatgcctt gatataatttt ctacaatgca tcaacgcatg tagaattatt atgagatggt 540
 ggctttggtg gaagtgcaaa tccaagaacc cactacttta tgatgccaac tactttggtt 600
 gctggcacac acataactat gactactgta taccatataa cagtgtcaca gatacaattg 660
 30 tcgttactga aggtgacggc atttcaacac caaaactcaa agaagactac caaattggtg 720
 gttattctga ggataggcac tcaggtgta aagactatgt cgttgtacat ggctatttca 780
 ccgaagtta ctaccagctt gagtctacac aaattactac agacactggt attgaaaatg 840
 35 ctacattctt catctttaac aagcttgta aagaccacc gaatgtgcaa atacacacaa 900
 tcgacggctc ttcaggagtt gctaattcag caatggatcc aatttatgat gagccgacga 960
 cgactactag cgtgcctttg taagcacaag aaagtgagta cgaacttatg tactcattcg 1020
 40 tttcggaaga aacagggtacg ttaatagta atagcgtact tctttttctt gctttcgtgg 1080
 tattccttgct agtcacacta gccatcctta ctgcgcttcg attgtgtgcg tactg 1135

45 <210> 9
 <211> 1096
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (137)..(958)
 <223>

55 <400> 9

EP 1 694 829 B1

tcttgctttg ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa ggggtgcatgc tcttgtggtt 60
cttgctgcaa gtttgatgag gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt 120
5 acacataaac gaactt atg gat ttg ttt atg aga ttt ttt act ctt gga tca 172
Met Asp Leu Phe Met Arg Phe Phe Thr Leu Gly Ser
1 5 10
att act gca cag cca gta aaa att gac aat gct tct cct gca agt act 220
Ile Thr Ala Gln Pro Val Lys Ile Asp Asn Ala Ser Pro Ala Ser Thr
15
gtt cat gct aca gca acg ata ccg cta caa gcc tca ctc cct ttc gga 268
Val His Ala Thr Ala Thr Ile Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly
30
15 tgg ctt gtt att ggc gtt gca ttt ctt gct gtt ttt cag agc gct acc 316
Trp Leu Val Ile Gly Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Thr
45 50 55 60
aaa ata att gcg ctc aat aaa aga tgg cag cta gcc ctt tat aag ggc 364
Lys Ile Ile Ala Leu Asn Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Tyr Lys Gly
20 65 70 75
ttc cag ttc att tgc aat tta ctg ctg cta ttt gtt acc atc tat tca 412
Phe Gln Phe Ile Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Ile Tyr Ser
25 80 85 90
cat ctt ttg ctt gtc gct gca ggt atg gag gcg caa ttt ttg tac ctc 460
His Leu Leu Leu Val Ala Ala Gly Met Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Leu
95 100 105
tat gcc ttg ata tat ttt cta caa tgc atc aac gca tgt aga att att 508
Tyr Ala Leu Ile Tyr Phe Leu Gln Cys Ile Asn Ala Cys Arg Ile Ile
30 110 115 120
atg aga tgt tgg ctt tgt tgg aag tgc aaa tcc aag aac cca tta ctt 556
Met Arg Cys Trp Leu Cys Trp Lys Cys Lys Ser Lys Asn Pro Leu Leu
125 130 135 140
35 tat gat gcc aac tac ttt gtt tgc tgg cac aca cat aac tat gac tac 604
Tyr Asp Ala Asn Tyr Phe Val Cys Trp His Thr His Asn Tyr Asp Tyr
145 150 155
tgt ata cca tat aac agt gtc aca gat aca att gtc gtt act gaa ggt 652
Cys Ile Pro Tyr Asn Ser Val Thr Asp Thr Ile Val Val Thr Glu Gly
40 160 165 170
gac ggc att tca aca cca aaa ctc aaa gaa gac tac caa att ggt ggt 700
Asp Gly Ile Ser Thr Pro Lys Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly
45 175 180 185
tat tct gag gat agg cac tca ggt gtt aaa gac tat gtc gtt gta cat 748
Tyr Ser Glu Asp Arg His Ser Ser Gly Val Lys Asp Tyr Val Val Val His
190 195 200
50 ggc tat ttc acc gaa gtt tac tac cag ctt gag tct aca caa att act 796
Gly Tyr Phe Thr Glu Val Tyr Tyr Gln Leu Glu Ser Thr Gln Ile Thr
205 210 215 220
aca gac act ggt att gaa aat gct aca ttc ttc atc ttt aac aag ctt 844

55

EP 1 694 829 B1

Thr Asp Thr Gly Ile Glu Asn Ala Thr Phe Phe Ile Phe Asn Lys Leu
225 230 235

5 gtt aaa gac cca ccg aat gtg caa ata cac aca atc gac ggc tct tca 892
Val Lys Asp Pro Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser
240 245 250

gga gtt gct aat cca gca atg gat cca att tat gat gag ccg acg acg 940
Gly Val Ala Asn Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr
255 260 265

10 act act agc gtg cct ttg taagcacaag aaagtgagta cgaacttatg 988
Thr Thr Ser Val Pro Leu
270

15 tactcattcg tttcgggaaga aacaggtacg ttaatagtta atagcgtact tctttttctt 1048
gctttcgtgg tattcttgct agtcacacta gccatcctta ctgcgctt 1096

20 <210> 10
<211> 274
<212> PRT
<213> CORONAVIRUS

25 <400> 10

Met Asp Leu Phe Met Arg Phe Phe Thr Leu Gly Ser Ile Thr Ala Gln
1 5 10 15

30 Pro Val Lys Ile Asp Asn Ala Ser Pro Ala Ser Thr Val His Ala Thr
20 25 30

35 Ala Thr Ile Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly Trp Leu Val Ile
35 40 45

Gly Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Thr Lys Ile Ile Ala
50 55 60

40 Leu Asn Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Tyr Lys Gly Phe Gln Phe Ile
65 70 75 80

45 Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Ile Tyr Ser His Leu Leu Leu
85 90 95

Val Ala Ala Gly Met Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Leu Tyr Ala Leu Ile
100 105 110

50 Tyr Phe Leu Gln Cys Ile Asn Ala Cys Arg Ile Ile Met Arg Cys Trp
115 120 125

55 Leu Cys Trp Lys Cys Lys Ser Lys Asn Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Asn
130 135 140

EP 1 694 829 B1

Tyr Phe Val Cys Trp His Thr His Asn Tyr Asp Tyr Cys Ile Pro Tyr
 145 150 155 160
 5 Asn Ser Val Thr Asp Thr Ile Val Val Thr Glu Gly Asp Gly Ile Ser
 165 170 175
 Thr Pro Lys Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Glu Asp
 10 180 185 190
 Arg His Ser Gly Val Lys Asp Tyr Val Val Val His Gly Tyr Phe Thr
 195 200 205
 15 Glu Val Tyr Tyr Gln Leu Glu Ser Thr Gln Ile Thr Thr Asp Thr Gly
 210 215 220
 Ile Glu Asn Ala Thr Phe Phe Ile Phe Asn Lys Leu Val Lys Asp Pro
 20 225 230 235 240
 Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser Gly Val Ala Asn
 245 250 255
 25 Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr Thr Thr Ser Val
 260 265 270

Pro Leu

30 <210> 11
 <211> 1096
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 35 <220>
 <221> CDS
 <222> (558)..(1019)
 <223>
 40 <400> 11

tcttgctttg ttgcatgact agttggttga gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgtggtt 60
 45 cttgctgcaa gtttgatgag gatgactctg agccagttct caaggggtgac aaattacatt 120
 acacataaac gaacttatgg atttgtttat gagatTTTTT actcttggat caattactgc 180
 acagccagta aaaattgaca atgcttctcc tgcaagtact gttcatgcta cagcaacgat 240
 50 accgctacaa gcctcactcc ctttcggatg gcttgttatt ggcgttgcat ttcttgctgt 300
 ttttcagagc gctacaaaa taattgcgct caataaaaga tggcagctag ccctttataa 360

55

EP 1 694 829 B1

420 gggcttccag ttcatttgca atttactgct gctatttggt accatctatt cacatctttt
 480 gcttgtcgct gcaggtatgg aggcgcaatt tttgtacctc tatgccttga tatattttct
 5 acaatgcadc aacgcatgta gaattattat gagatggttg ctttgttgga agtgcaaatc 540
 caagaacca ttacttt atg atg cca act act ttg ttt gct ggc aca cac 590
 Met Met Pro Thr Thr Leu Phe Ala Gly Thr His
 1 5 10
 638 ata act atg act act gta tac cat ata aca gtg tca cag ata caa ttg
 Ile Thr Met Thr Thr Val Tyr His Ile Thr Val Ser Gln Ile Gln Leu
 15 20 25
 686 tcg tta ctg aag gtg acg gca ttt caa cac caa aac tca aag aag act
 Ser Leu Leu Lys Val Thr Ala Phe Gln His Gln Asn Ser Lys Lys Thr
 15 30 35 40
 734 acc aaa ttg gtg gtt att ctg agg ata ggc act cag gtg tta aag act
 Thr Lys Leu Val Val Ile Leu Arg Ile Gly Thr Gln Val Leu Lys Thr
 45 50 55
 20 782 atg tcg ttg tac atg gct att tca ccg aag ttt act acc agc ttg agt
 Met Ser Leu Tyr Met Ala Ile Ser Pro Lys Phe Thr Thr Ser Leu Ser
 60 65 70 75
 25 830 cta cac aaa tta cta cag aca ctg gta ttg aaa atg cta cat tct tca
 Leu His Lys Leu Leu Gln Thr Leu Val Leu Lys Met Leu His Ser Ser
 80 85 90
 878 tct tta aca agc ttg tta aag acc cac cga atg tgc aaa tac aca caa
 Ser Leu Thr Ser Leu Leu Lys Thr His Arg Met Cys Lys Tyr Thr Gln
 95 100 105
 30 926 tcg acg gct ctt cag gag ttg cta atc cag caa tgg atc caa ttt atg
 Ser Thr Ala Leu Gln Glu Leu Leu Ile Gln Gln Trp Ile Gln Phe Met
 110 115 120
 35 974 atg agc cga cga cga cta cta gcg tgc ctt tgt aag cac aag aaa gtg
 Met Ser Arg Arg Arg Leu Leu Ala Cys Leu Cys Lys His Lys Lys Val
 125 130 135
 1019 agt acg aac tta tgt act cat tcg ttt cgg aag aaa cag gta cgt
 Ser Thr Asn Leu Cys Thr His Ser Phe Arg Lys Lys Gln Val Arg
 140 145 150
 40 1079 taatagttaa tagcgtactt ctttttcttg ctttcgtggt attcttgcta gtcacactag
 1096 ccaccttac tgcgctt
 45 <210> 12
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS
 50 <400> 12
 55 Met Met Pro Thr Thr Leu Phe Ala Gly Thr His Ile Thr Met Thr Thr
 1 5 10 15

EP 1 694 829 B1

Val Tyr His Ile Thr Val Ser Gln Ile Gln Leu Ser Leu Leu Lys Val
 20 25 30

5 Thr Ala Phe Gln His Gln Asn Ser Lys Lys Thr Thr Lys Leu Val Val
 35 40 45

10 Ile Leu Arg Ile Gly Thr Gln Val Leu Lys Thr Met Ser Leu Tyr Met
 50 55 60

15 Ala Ile Ser Pro Lys Phe Thr Thr Ser Leu Ser Leu His Lys Leu Leu
 65 70 75 80

20 Gln Thr Leu Val Leu Lys Met Leu His Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu
 85 90 95

25 Leu Lys Thr His Arg Met Cys Lys Tyr Thr Gln Ser Thr Ala Leu Gln
 100 105 110

30 Glu Leu Leu Ile Gln Gln Trp Ile Gln Phe Met Met Ser Arg Arg Arg
 115 120 125

35 Leu Leu Ala Cys Leu Cys Lys His Lys Lys Val Ser Thr Asn Leu Cys
 130 135 140

40 Thr His Ser Phe Arg Lys Lys Gln Val Arg
 145 150

<210> 13
 <211> 332
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

<220>
 <221> CDS
 <222> (36)..(263)
 <223>

<400> 13

45 tgcctttgta agcacaagaa agtgagtacg aactt atg tac tca ttc gtt tcg 53
 Met Tyr Ser Phe Val Ser
 1 5

50 gaa gaa aca ggt acg tta ata gtt aat agc gta ctt ctt ttt ctt gct 101
 Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser Val Leu Leu Phe Leu Ala
 10 15 20

55 ttc gtg gta ttc ttg cta gtc aca cta gcc atc ctt act gcg ctt cga 149
 Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala Ile Leu Thr Ala Leu Arg
 25 30 35

EP 1 694 829 B1

ttg tgt gcg tac tgc tgc aat att gtt aac gtg agt tta gta aaa cca 197
 Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn Val Ser Leu Val Lys Pro
 40 45 50
 5 acg gtt tac gtc tac tcg cgt gtt aaa aat ctg aac tct tct gaa gga 245
 Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn Ser Ser Glu Gly
 55 60 65 70
 10 gtt cct gat ctt ctg gtc taaacgaact aactattatt attattctgt 293
 Val Pro Asp Leu Leu Val
 75
 ttggaacttt aacattgctt atcatggcag acaacggta 332
 15 <210> 14
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS
 20 <400> 14
 25 Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala
 20 25 30
 30 Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn
 35 40 45
 35 Val Ser Leu Val Lys Pro Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn
 50 55 60
 40 Leu Asn Ser Ser Glu Gly Val Pro Asp Leu Leu Val
 65 70 75
 45 <210> 15
 <211> 332
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 50 tgccctttgta agcacaagaa agtgagtacg aacttatgta ctattcgtt tcggaagaaa 60
 caggtagctt aatagttaat agcgtacttc tttttcttgc tttcgtggta ttcttgctag 120
 55 tcacactagc catccttact gcgcttcgat tgtgtgcgta ctgctgcaat attgttaacg 180
 tgagtttagt aaaaccaacg gtttacgtct actcgcgtgt taaaaatctg aactcttctg 240
 aaggagttcc tgatcttctg gtctaaacga actaactatt attattattc tgtttggaac 300
 55 tttaacattg cttatcatgg cagacaacgg ta 332

EP 1 694 829 B1

<210> 16
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (41)..(703)
 <223>

10

<400> 16

15	tattattatt attctgtttg gaactttaac attgcttatac atg gca gac aac ggt	55
	Met Ala Asp Asn Gly	
	1 5	
20	act att acc gtt gag gag ctt aaa caa ctc ctg gaa caa tgg aac cta	103
	Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu Glu Gln Trp Asn Leu	
	10 15 20	
25	gta ata ggt ttc cta ttc cta gcc tgg att atg tta cta caa ttt gcc	151
	Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Ile Met Leu Leu Gln Phe Ala	
	25 30 35	
30	tat tct aat cgg aac agg ttt ttg tac ata ata aag ctt gtt ttc ctc	199
	Tyr Ser Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile Ile Lys Leu Val Phe Leu	
	40 45 50	
35	tgg ctc ttg tgg cca gta aca ctt gct tgt ttt gtg ctt gct gct gtc	247
	Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys Phe Val Leu Ala Ala Val	
	55 60 65	
40	tac aga att aat tgg gtg act ggc ggg att gcg att gca atg gct tgt	295
	Tyr Arg Ile Asn Trp Val Thr Gly Gly Ile Ala Ile Ala Met Ala Cys	
	70 75 80 85	
45	att gta ggc ttg atg tgg ctt agc tac ttc gtt gct tcc ttc agg ctg	343
	Ile Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe Val Ala Ser Phe Arg Leu	
	90 95 100	
50	ttt gct cgt acc cgc tca atg tgg tca ttc aac cca gaa aca aac att	391
	Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe Asn Pro Glu Thr Asn Ile	
	105 110 115	
55	ctt ctc aat gtg cct ctc cgg ggg aca att gtg acc aga ccg ctc atg	439
	Leu Leu Asn Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile Val Thr Arg Pro Leu Met	
	120 125 130	
60	gaa agt gaa ctt gtc att ggt gct gtg atc att cgt ggt cac ttg cga	487
	Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile Ile Arg Gly His Leu Arg	
	135 140 145	
65	atg gcc gga cac tcc cta ggg cgc tgt gac att aag gac ctg cca aaa	535
	Met Ala Gly His Ser Leu Gly Arg Cys Asp Ile Lys Asp Leu Pro Lys	
	150 155 160 165	

EP 1 694 829 B1

gag atc act gtg gct aca tca cga acg ctt tct tat tac aaa tta gga 583
 Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Leu Gly
 170 175 180

5 gcg tcg cag cgt gta ggc act gat tca ggt ttt gct gca tac aac cgc 631
 Ala Ser Gln Arg Val Gly Thr Asp Ser Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Arg
 185 190 195

10 tac cgt att gga aac tat aaa tta aat aca gac cac gcc ggt agc aac 679
 Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr Asp His Ala Gly Ser Asn
 200 205 210

15 gac aat att gct ttg cta gta cag taagt 708
 Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln
 215 220

<210> 17
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS

20 <400> 17

25 Met Ala Asp Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu
 1 5 10 15

30 Glu Gln Trp Asn Leu Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Ile Met
 20 25 30

35 Leu Leu Gln Phe Ala Tyr Ser Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile Ile
 35 40 45

40 Lys Leu Val Phe Leu Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys Phe
 50 55 60

45 Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp Val Thr Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80

50 Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe Val
 85 90 95

55 Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe Asn
 100 105 110

60 Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile Val
 115 120 125

65 Thr Arg Pro Leu Met Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile Ile
 130 135 140

70 Arg Gly His Leu Arg Met Ala Gly His Ser Leu Gly Arg Cys Asp Ile
 145 150 155 160

EP 1 694 829 B1

Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Ser
 165 170 175

5 Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Ser Gln Arg Val Gly Thr Asp Ser Gly Phe
 180 185 190

10 Ala Ala Tyr Asn Arg Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr Asp
 195 200 205

His Ala Gly Ser Asn Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln
 210 215 220

15 <210> 18
 <211> 769
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 20 <400> 18

25 cctgatcttc tggctctaac gaactaacta ttattattat tctgtttgga actttaacat 60
 tgcttatcat ggcagacaac ggtactatta ccggtgagga gcttaaaca ctcctggaac 120
 aatggaacct agtaataggt ttcctattcc tagcctggat tatgttacta caatttgcct 180
 attctaactg gaacagggtt ttgtacataa taaagcttgt tttcctctgg ctcttgtggc 240
 30 cagtaacact tgcttgTTTT gtgcttgctg ctgtctacag aattaattgg gtgactggcg 300
 ggattgcatg tgcaatggct tgtattgtag gcttgatgtg gcttagctac ttcgttgctt 360
 ccttcaggct gtttgctcgt acccgctcaa tgtggtcatt caaccagaa acaaacattc 420
 35 ttctcaatgt gcctctccgg gggacaattg tgaccagacc gctcatggaa agtgaacttg 480
 tcattggtgc tgtgatcatt cgtggtcact tgcgaatggc cggacactcc ctagggcgct 540
 gtgacattaa ggacctgcca aaagagatca ctgtggctac atcacgaacg ctttcttatt 600
 40 acaaattagg agcgtcgcag cgtgtaggca ctgattcagg ttttgctgca tacaaccgct 660
 accgtattgg aaactataaa ttaaatacag accacgccgg tagcaacgac aatattgctt 720
 tgctagtaca gtaagtgaca acagatgttt catcttgttg acttccagg 769

45 <210> 19
 <211> 1231
 <212> DNA
 50 <213> CORONAVIRUS
 <400> 19

55 taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60

EP 1 694 829 B1

	gctagtac agtaagtgac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc	120
	agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaaatc ttgacgttat	180
5	aataagttca atagtgagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggagtt	240
	agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaaac gaacatgaaa attattctct	300
	tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgttagag	360
10	gtacgactgt actactaaaa gaaccttgcc catcaggaac atacgagggc aattcaccat	420
	ttcacctctt tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg	480
	cttgtgctga cggtactcga catacctatc agctgcgtgc aagatcagtt tcaccaaaac	540
15	ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctattgttg	600
	ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacagaa tgaatgagct	660
	cactttaatt gacttctatt tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat	720
20	gcttattata ttttggtttt cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt	780
	ctaaacgaac atgaaacttc tcattgtttt gacttgtatt tctctatgca gttgcatatg	840
	cactgtagta cagcgctgtg catctaataa acctcatgtg cttgaagatc cttgtaaggt	900
25	acaacactag gggtaatact tatagcactg cttggctttg tgctctagga aaggttttac	960
	cttttcatag atggcacact atggttcaaa catgcacacc taatgttact atcaactgtc	1020
	aagatccagc tgggtggtgcg cttatagcta ggtgttggtgta cttcatgaa ggtcaccaaa	1080
30	ctgctgcatt tagagacgta cttgttgttt taaataaacg aacaaattaa aatgtctgat	1140
	aatggacccc aatcaaacca acgtagtgcc ccccgcatca catttggtgg acccacagat	1200
	tcaactgaca ataaccagaa tggaggacgc a	1231
35	<210> 20	
	<211> 1242	
	<212> DNA	
	<213> CORONAVIRUS	
40	<400> 20	
	gcatacaacc gctaccgtat tggaaactat aaattaaata cagaccacgc cggtagcaac	60
45	gacaatattg ctttgctagt acagtaagtg acaacagatg tttcatcttg ttgacttcca	120
	ggttacaata gcagagatat tgattatcat tatgaggact ttcaggattg ctatttggaa	180
	tcttgacggt ataataagtt caatagtgag acagttattt aagcctctaa ctaagaagaa	240
50	ttattcggag ttagatgatg aagaacctat ggagttagat tatccataaa acgaacatga	300
	aaattattct cttcctgaca ttgattgtat ttacatcttg cgagctatat cactatcagg	360
	agtgtgttag aggtacgact gtactactaa aagaaccttg cccatcagga acatacgagg	420
55	gcaattcacc atttcaccct cttgctgaca ataaatttgc actaacttgc actagcacac	480

EP 1 694 829 B1

actttgcttt tgcttgtgct gacggctactc gacataccta tcagctgcgt gcaagatcag 540
 tttcaccaaa acttttcatc agacaagagg aggttcaaca agagctctac tcgccacttt 600
 5 ttctcattgt tgctgctcta gtatttttaa tactttgctt caccattaag agaaagacag 660
 aatgaatgag ctcaacttaa ttgacttcta tttgtgcttt ttagcctttc tgctattcct 720
 tgttttaata atgcttatta tattttgggt ttcactcgaa atccaggatc tagaagaacc 780
 10 ttgtaccaaa gtctaaacga acatgaaact tctcattggt ttgacttgta tttctctatg 840
 cagttgcata tgcaactgtag tacagcgctg tgcactctaat aaacctcatg tgcttgaaga 900
 tccttgtaag gtacaacact aggggtaata cttatagcac tgcttggctt tgtgctctag 960
 15 gaaaggtttt accttttcat agatggcaca ctatggttca aacatgcaca cctaagtgtta 1020
 ctatcaactg tcaagatcca gctgggtggtg cgcttatagc taggtggttg taccttcatg 1080
 aaggtcacca aactgctgca tttagagacg tacttgttgt tttaaataaa cgaacgaatt 1140
 20 aaaatgtctg ataatggacc ccaatcaaac caacgtagtg ccccccgcac tacatttggg 1200
 ggaccacag attcaactga caataaccag aatggaggac gc 1242

25 <210> 21
 <211> 1231
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (86)..(274)
 <223>

35 <400> 21

taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60
 ttgctagtac agtaagtgac aacag atg ttt cat ctt gtt gac ttc cag gtt 112
 40 Met Phe His Leu Val Asp Phe Gln Val
 1 5
 aca ata gca gag ata ttg att atc att atg agg act ttc agg att gct 160
 Thr Ile Ala Glu Ile Leu Ile Ile Ile Met Arg Thr Phe Arg Ile Ala
 10 15 20 25
 45 att tgg aat ctt gac gtt ata ata agt tca ata gtg aga caa tta ttt 208
 Ile Trp Asn Leu Asp Val Ile Ile Ser Ser Ile Val Arg Gln Leu Phe
 30 35 40
 50 aag cct cta act aag aag aat tat tcg gag tta gat gat gaa gaa cct 256
 Lys Pro Leu Thr Lys Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Asp Asp Glu Glu Pro
 45 50 55
 atg gag tta gat tat cca taaacgaac atgaaaatta ttctcttct 304

55

EP 1 694 829 B1

Met Glu Leu Asp Tyr Pro
60

5 gacattgatt gtatttacat cttgcgagct atatcactat caggagtgtg ttagaggtag 364
 gactgtacta ctaaaagaac cttgcccac aggaacatac gagggcaatt caccatttca 424
 ccctcttgct gacaataaat ttgcactaac ttgcactagc acacactttg cttttgcttg 484
 10 tgctgacggt actcgacata cctatcagct gcgtgcaaga tcagtttcac caaaactttt 544
 catcagacaa gaggaggttc aacaagagct ctactcgcca ctttttctca ttgttgctgc 604
 tctagtattt ttaatacttt gcttcacat taagagaaag acagaatgaa tgagctcact 664
 15 ttaattgact tctatttgtg ctttttagcc tttctgctat tccttgtttt aataatgctt 724
 attatatttt ggttttctc cgaaatccag gatctagaag aaccttgtag caaagtctaa 784
 acgaacatga aacttctcat tgttttgact tgtatttctc tatgcagttg catatgcact 844
 20 gtagtacagc gctgtgcatc taataaacct catgtgcttg aagatccttg taaggtagaa 904
 cactaggggt aatacttata gcactgcttg gctttgtgct ctaggaaagg ttttaccttt 964
 tcatagatgg cacactatgg ttcaaactat cacaccta gttactatca actgtcaaga 1024
 25 tccagctggt ggtgcgctta tagctaggtg ttggtacctt catgaaggtc accaaactgc 1084
 tgcatttaga gacgtacttg ttgttttaaa taaacgaaca aattaaaatg tctgataatg 1144
 gacccaatc aaaccaacgt agtgccccc gcattacatt tggtaggaccc acagattcaa 1204
 30 ctgacaataa ccagaatgga ggacgca 1231

<210> 22

<211> 63

<212> PRT

35 <213> CORONAVIRUS

<400> 22

40 Met Phe His Leu Val Asp Phe Gln Val Thr Ile Ala Glu Ile Leu Ile
 1 5 10 15
 45 Ile Ile Met Arg Thr Phe Arg Ile Ala Ile Trp Asn Leu Asp Val Ile
 20 25 30
 Ile Ser Ser Ile Val Arg Gln Leu Phe Lys Pro Leu Thr Lys Lys Asn
 35 40 45
 50 Tyr Ser Glu Leu Asp Asp Glu Glu Pro Met Glu Leu Asp Tyr Pro
 50 55 60

<210> 23

55 <211> 1231

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

EP 1 694 829 B1

<220>
 <221> CDS
 <222> (285)..(650)
 <223>

5
 <400> 23

	taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct	60
10	ttgctagtagc agtaagtac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc	120
	agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat	180
	aataagttca atagtggagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggagtt	240
15	agatgatgaa gaacctatgg agtttagatta tccataaaac gaac atg aaa att att	296
		Met Lys Ile Ile 1
	ctc ttc ctg aca ttg att gta ttt aca tct tgc gag cta tat cac tat	344
20	Leu Phe Leu Thr Leu Ile Val Phe Thr Ser Cys Glu Leu Tyr His Tyr	5 10 15 20
	cag gag tgt gtt aga ggt acg act gta cta cta aaa gaa cct tgc cca	392
	Gln Glu Cys Val Arg Gly Thr Thr Val Leu Leu Lys Glu Pro Cys Pro	25 30 35
25	tca gga aca tac gag ggc aat tca cca ttt cac cct ctt gct gac aat	440
	Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Asn Ser Pro Phe His Pro Leu Ala Asp Asn	40 45 50
	aaa ttt gca cta act tgc act agc aca cac ttt gct ttt gct tgt gct	488
30	Lys Phe Ala Leu Thr Cys Thr Ser Thr His Phe Ala Phe Ala Cys Ala	55 60 65
	gac ggt act cga cat acc tat cag ctg cgt gca aga tca gtt tca cca	536
	Asp Gly Thr Arg His Thr Tyr Gln Leu Arg Ala Arg Ser Val Ser Pro	70 75 80
35	aaa ctt ttc atc aga caa gag gag gtt caa caa gag ctc tac tcg cca	584
	Lys Leu Phe Ile Arg Gln Glu Glu Val Gln Gln Glu Leu Tyr Ser Pro	85 90 95 100
	ctt ttt ctc att gtt gct gct cta gta ttt tta ata ctt tgc ttc acc	632
40	Leu Phe Leu Ile Val Ala Ala Leu Val Phe Leu Ile Leu Cys Phe Thr	105 110 115
	att aag aga aag aca gaa tgaatgagct cactttaatt gacttctatt	680
	Ile Lys Arg Lys Thr Glu	120
45	tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat gcttattata ttttggtttt	740
	cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt ctaaactgaac atgaaacttc	800
	tcattgtttt gacttgtatt tctctatgca gttgcatatg cactgtagta cagcgctgtg	860
50	catctaataa acctcatgtg cttgaagatc cttgtaaggt acaactag gggttaact	920

55

EP 1 694 829 B1

tatagcactg cttggctttg tgctctagga aaggttttac cttttcatag atggcacact 980
 atgggtcaaaa catgcacacc taatgttact atcaactgtc aagatccagc tgggtggtgcg 1040
 5 cttatagcta ggtgttgga ctttcatgaa ggtcaccaaaa ctgctgcatt tagagacgta 1100
 cttgttgttt taaataaacg aacaaattaa aatgtctgat aatggacccc aatcaaacca 1160
 acgtagtgcc ccccgcatta catttggtgg acccacagat tcaactgaca ataaccagaa 1220
 10 tggaggacgc a 1231

<210> 24
 <211> 122
 15 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS

<400> 24

20 Met Lys Ile Ile Leu Phe Leu Thr Leu Ile Val Phe Thr Ser Cys Glu
 1 5 10 15

25 Leu Tyr His Tyr Gln Glu Cys Val Arg Gly Thr Thr Val Leu Leu Lys
 20 25 30

Glu Pro Cys Pro Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Asn Ser Pro Phe His Pro
 35 40 45

30 Leu Ala Asp Asn Lys Phe Ala Leu Thr Cys Thr Ser Thr His Phe Ala
 50 55 60

35 Phe Ala Cys Ala Asp Gly Thr Arg His Thr Tyr Gln Leu Arg Ala Arg
 65 70 75 80

Ser Val Ser Pro Lys Leu Phe Ile Arg Gln Glu Glu Val Gln Gln Glu
 85 90 95

40 Leu Tyr Ser Pro Leu Phe Leu Ile Val Ala Ala Leu Val Phe Leu Ile
 100 105 110

45 Leu Cys Phe Thr Ile Lys Arg Lys Thr Glu
 115 120

<210> 25
 <211> 1231
 50 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

<220>
 <221> CDS
 55 <222> (650)..(781)
 <223>

<400> 25

EP 1 694 829 B1

taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60
 ttgctagtac agtaagtgac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc 120
 5 agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat 180
 aataagttca atagtgagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggagtt 240
 agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaaac gaacatgaaa attattctct 300
 10 tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgttagag 360
 gtacgactgt actactaaaa gaaccttgcc catcaggaac atacgagggc aattcacat 420
 ttcaccctct tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg 480
 15 cttgtgctga cggtactcga catacctatc agctgcgtgc aagatcagtt tcaccaaacc 540
 ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctcatgttg 600
 ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacaga atg aat gag 658
 20 Met Asn Glu
 1
 ctc act tta att gac ttc tat ttg tgc ttt tta gcc ttt ctg cta ttc 706
 Leu Thr Leu Ile Asp Phe Tyr Leu Cys Phe Leu Ala Phe Leu Leu Phe
 5 10 15
 25 ctt gtt tta ata atg ctt att ata ttt tgg ttt tca ctc gaa atc cag 754
 Leu Val Leu Ile Met Leu Ile Ile Phe Trp Phe Ser Leu Glu Ile Gln
 20 25 30 35
 30 gat cta gaa gaa cct tgt acc aaa gtc taaacgaaca tgaaacttct 801
 Asp Leu Glu Glu Pro Cys Thr Lys Val
 40
 cattgttttg acttgtattt ctctatgcag ttgcatatgc actgtagtac agcgctgtgc 861
 atctaataaa cctcatgtgc ttgaagatcc ttgtaaggta caacactagg ggtaataactt 921
 35 atagcactgc ttggctttgt gctctaggaa aggttttacc ttttcataga tggcacacta 981
 tggttcaaac atgcacacct aatgttacta tcaactgtca agatccagct ggtggtgctgc 1041
 ttatagctag gtgttggtac cttcatgaag gtcaccaaac tgctgcattt agagacgtac 1101
 40 ttgttgtttt aaataaacga acaaattaaa atgtctgata atggacccca atcaaaccaa 1161
 cgtagtgccc cccgcattac atttggtgga cccacagatt caactgacaa taaccagaat 1221
 ggaggacgca 1231
 45
 <210> 26
 <211> 44
 <212> PRT
 50 <213> CORONAVIRUS
 <400> 26
 55

EP 1 694 829 B1

Met Asn Glu Leu Thr Leu Ile Asp Phe Tyr Leu Cys Phe Leu Ala Phe
 1 5 10 15

5 Leu Leu Phe Leu Val Leu Ile Met Leu Ile Ile Phe Trp Phe Ser Leu
 20 25 30

10 Glu Ile Gln Asp Leu Glu Glu Pro Cys Thr Lys Val
 35 40

15 <210> 27
 <211> 1231
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (791)..(907)
 <223>

<400> 27

25 taccgtattg gaaactataa attaaatata gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60
 ttgctagtag agtaagtgac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc 120
 agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat 180
 30 aataagttca atagtgagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggagtt 240
 agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaac gaacatgaaa attattctct 300
 tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgtagag 360
 35 gtacgactgt actactaaa gaaccttgcc catcaggaac atacgagggc aattcaccat 420
 ttcaccctct tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg 480
 cttgtgctga cggtagctga catacctatc agctgctgac aagatcagtt tcaccaaaac 540
 40 ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctcatgttg 600
 ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacagaa tgaatgagct 660
 cactttaatt gacttctatt tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat 720
 45 gcttattata ttttggtttt cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt 780
 ctaaacgaac atg aaa ctt ctc att gtt ttg act tgt att tct cta tgc 829

50

55

EP 1 694 829 B1

Met Lys Leu Leu Ile Val Leu Thr Cys Ile Ser Leu Cys
 1 5 10

5 agt tgc ata tgc act gta gta cag cgc tgt gca tct aat aaa cct cat 877
 Ser Cys Ile Cys Thr Val Val Gln Arg Cys Ala Ser Asn Lys Pro His
 15 20 25

gtg ctt gaa gat cct tgt aag gta caa cac taggggtaat acttatagca 927
 Val Leu Glu Asp Pro Cys Lys Val Gln His
 30

10 ctgcttggct ttgtgctcta ggaaagggtt taccttttca tagatggcac actatggttc 987

aaacatgcac acctaattgtt actatcaact gtcaagatcc agctgggtggt gcgcttatag 1047

15 ctagggtgtg gtaccttcat gaaggtcacc aaactgctgc atttagagac gtacttgttg 1107

ttttaaataa acgaacaaat taaaatgtct gataatggac cccaatcaaa ccaacgtagt 1167

gcccccgca ttacatttgg tggaccaca gattcaactg acaataacca gaatggagga 1227

20 cgca 1231

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> CORONAVIRUS

<400> 28

30 Met Lys Leu Leu Ile Val Leu Thr Cys Ile Ser Leu Cys Ser Cys Ile
 1 5 10 15

Cys Thr Val Val Gln Arg Cys Ala Ser Asn Lys Pro His Val Leu Glu
 20 25 30

35 Asp Pro Cys Lys Val Gln His
 35

40 <210> 29

<211> 1231

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

45 <220>

<221> CDS

<222> (876)..(1127)

<223>

50 <400> 29

55

EP 1 694 829 B1

Met Cys Leu Lys Ile Leu Val Arg Tyr Asn Thr Arg Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10 15
 5 ser Thr Ala Trp Leu Cys Ala Leu Gly Lys Val Leu Pro Phe His Arg
 20 25 30
 Trp His Thr Met Val Gln Thr Cys Thr Pro Asn Val Thr Ile Asn Cys
 10 35 40 45
 Gln Asp Pro Ala Gly Gly Ala Leu Ile Ala Arg Cys Trp Tyr Leu His
 50 55 60
 15 Glu Gly His Gln Thr Ala Ala Phe Arg Asp Val Leu Val Val Leu Asn
 65 70 75 80

Lys Arg Thr Asn

20
 <210> 31
 <211> 21221
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 25
 <400> 31

atggagagcc ttgttcttgg tgtcaacgag aaaacacacg tccaactcag tttgcctgtc 60
 30 cttcagggtta gagacgtgct agtgcgtggc ttcggggact ctgtggaaga ggcctatcgc 120
 gaggcacgtg aacacctcaa aaatggcact tgtgggtctag tagagctgga aaaaggcgta 180
 ctgccccagc ttgaacagcc ctatgtgttc attaaacggt ctgatgcctt aagcaccaat 240
 35 cacggccaca aggtcgttga gctggttgca gaaatggacg gcattcagta cggtcgtagc 300
 ggtataacac tgggagtact cgtgccacat gtgggcgaaa cccaattgc ataccgcaat 360
 gttcttcttc gtaagaacgg taataagga gccgggtggc atagctatgg catcgatcta 420
 40 aagtcttatg acttaggtga cgagcttggc actgatcca ttgaagatta tgaacaaaac 480
 tggaacacta agcatggcag tgggtgcactc cgtgaactca ctcgtgagct caatggaggt 540
 gcagtcactc gctatgtcga caacaatttc tgtggcccag atgggtacc tcttgattgc 600
 45 atcaaagatt ttctcgcacg cgcgggcaag tcaatgtgca ctcttccga acaacttgat 660
 tacatcgagt cgaagagagg tgtctactgc tgccgtgacc atgagcatga aattgcctgg 720
 ttcactgagc gctctgataa gagctacgag caccagacac ccttcgaaat taagagtgcc 780
 50 aagaaatttg acactttcaa aggggaatgc ccaaagtttg tgttctctet taactcaaaa 840
 gtcaaagtca ttcaaccacg tgttgaaaag aaaaagactg agggtttcat ggggcgtata 900
 cgctctgtgt accctgttgc atctccacag gagtgtaaca atatgcactt gtctaccttg 960
 55

EP 1 694 829 B1

atgaaatgta atcattgCGA tgaagtttca tggcagacgt gCGactttct gaaagccact 1020
 tGTgaacatt gTggcactga aaatttagtt attgaaggac ctactacatg tgggtaccta 1080
 5 cctactaatg ctgtagtgaa aatGCCatgt cctGcctgtc aagaccaga gattggacct 1140
 gagcatagtG tTgcagatta tCaCaaccac tCaAacattg aaactCGact cCGcaaggga 1200
 ggtaggacta gatgTTTTgG aggctgtgtG tttGcctatg ttggctgcta taataagcgt 1260
 10 gcctactggg tTcctcgtgc tagtgctgat attggctcag gccatactgg cattactggT 1320
 gacaatgtgg agaccttgaa tgaggatctc cttgagatac tgagtcgtga acgtgttaac 1380
 attaacattg ttggcGatTT tCatttgaat gaagaggttG ccatcatttt ggcatctttc 1440
 15 tctGcttcta caagtGcctt tattgacact ataaagagtc ttgattaca gTctttcaaa 1500
 accattgttG agtcctgCGg taactataaa gttaccaagg gaaagcccgT aaaaggTgct 1560
 tggaacattg gacaacagag atcagTTTTa acaccactgt gtggTTTTcc ctCacaggct 1620
 20 gctggTgTta tCagatcaat ttttGcGcGc acacttgatg cagcaaacca ctcaattcct 1680
 gatttGcaaa gagcagctgt caccatactt gatggTatTT ctgaacagtc attacgtctt 1740
 gTcGacGcca tggTTTTatac tTcagacctg ctCaccaaca gtgtcattat tatggcatat 1800
 25 gtaactggTg gTcttTgtaca acagacttct cagTggTtGt ctaatctttt gggcactact 1860
 gttGaaaaac tCaggcctat ctttGaatgg attgaggcga aacttagtgc aggagttgaa 1920
 tttctcaagg atgcttggga gatttctaaa tttctcatta caggTgTTTT tgacatcGtc 1980
 30 aagggtcaaa tacaggTtGc tTcagataac atcaaggatt gtGtaaaatg cttcattgat 2040
 gttGttaaCa aggcactcga aatgtGcatt gatcaagtca ctatcGctgg cGcaaagTtG 2100
 cGatcactca acttaggtga agtcttcatc gTcCaagca agggacttta cGtCagTgt 2160
 35 atacgtggca aggagcagct gCaactactc atGcctctta aggcaccaa agaagtaacc 2220
 tttcttgaag gtgattcaca tgacacagta cttacctctg aggaggttGt tctcaagaac 2280
 ggtgaaactG aagcactcga gacGcccgtt gatagcttca caaatggagc tatcgttggc 2340
 40 acaccagtct gtGtaaatgg cctcatgctc ttagagatta aggacaaaga acaatactgc 2400
 gCattgtctc ctggTttact ggctacaac aatgtctttc gcttaaaagg gggTgcacca 2460
 attaaaggTg taacctttgG agaagatact gtttgggaag ttcaaggTta caagaatgtg 2520
 45 agaatcacat ttgagcttga tgaacgtgtt gacaagTgc ttaatgaaa gtGctctgtc 2580
 tacactgttG aatccggtac cgaagttact gagtttGcat gtgttGtagc agaggctgtt 2640
 gtgaagactt tacaaccagt ttctgatctc cttaccaaca tgggtattga tcttGatgag 2700
 tggagTtag ctacattcta cttatttgat gatgctggTg aagaaaactt ttcatcacgt 2760
 50 atgtattgtt ctttttacc tccagatgag gaagaagagg acgatgcaga gtgtgaggaa 2820
 gaagaaattg atgaaacctg tgaacatgag tacggTacag aggatgatta tcaaggTctc 2880
 cctctggaat ttggTgcctc agctgaaaca gttcGagTtG aggaagaaga agaggaagac 2940
 55 tggctggatg atactactga gcaatcagag attgagccag aaccagaacc tacacctgaa 3000

EP 1 694 829 B1

gaaccagtta atcagtttac tggttattta aaacttactg acaatgttgc cattaatgt 3060
 gttgacatcg ttaaggaggc acaaagtgc aatcctatgg tgattgtaa tgctgctaac 3120
 5 atacacctga aacatggtgg tggtagca ggtgcactca acaaggcaac caatggtgcc 3180
 atgcaaaagg agagtgatga ttacattaag ctaaaggcc ctcttacagt aggagggtct 3240
 tgtttgcttt ctggacataa tcttgctaag aagtgtctgc atggtggtgg acctaaccta 3300
 10 aatgcagggtg aggacatcca gcttcttaag gcagcatatg aaaatttcaa ttcacaggac 3360
 atcttacttg caccattggt gtcagcaggc atatttggtg ctaaaccact tcagtcttta 3420
 caagtgtgcg tgcagacggt tcgtacacag gtttatattg cagtcaatga caaagctctt 3480
 15 tatgagcagg ttgtcatgga ttatcttgat aacctgaagc ctagagtgga agcacctaaa 3540
 caagaggagc caccaaacac agaagattcc aaaactgagg agaaatctgt cgtacagaag 3600
 cctgtcgatg tgaagccaaa aattaaggcc tgcattgatg aggttaccac aacactggaa 3660
 20 gaaactaagt ttcttaccaa taagttactc ttgtttgctg atatcaatgg taagctttac 3720
 catgattctc agaacatgct tagaggtgaa gatatgtctt tccttgagaa ggatgcacct 3780
 tacatggtag gtgatgttat cactagtggg gatatcactt gtggtgtaat accctccaaa 3840
 25 aaggctggtg gcontactga gatgctctca agagctttga agaaagtgcc agttgatgag 3900
 tatataacca cgtaccctgg acaaggatgt gctggttata cacttgagga agctaagact 3960
 gctcttaaga aatgcaaatc tgcattttat gtactacctt cagaagcacc taatgctaag 4020
 30 gaagagattc taggaactgt atcctggaat ttgagagaaa tgcttgctca tgctgaagag 4080
 acaagaaaat taatgcctat atgcatggat gttagagcca taatggcaac catccaacgt 4140
 aagtataaag gaattaaaat tcaagagggc atcgttgact atggtgtccg attcttcttt 4200
 35 tatactagta aagagcctgt agcttctatt attacgaagc tgaactctct aatgagccg 4260
 cttgtcacia tgccaattgg ttatgtgaca catggtttta atcttgaaga ggctgctgct 4320
 tgtatgctgt ctcttaaagc tcctgccgta gtgtcagtat catcaccaga tgctgttact 4380
 40 acatataatg gatactcac ttcgtcatca aagacatctg aggagcactt tgtagaaaca 4440
 gtttctttgg ctggctctta cagagattgg tcctattcag gacagcgtac agagttaggt 4500
 gttgaatttc ttaagcgtgg tgacaaaatt gtgtaccaca ctctggagag ccccgctgag 4560
 45 tttcatcttg acggtgaggt tctttcactt gacaaactaa agagtctctt atccctgctg 4620
 gaggttaaga ctataaaagt gttcacaact gtggacaaca ctaatctcca cacacagctt 4680
 gtggatatgt ctatgacata tggacagcag tttggtccaa catacttggga tgggtctgat 4740
 50 gttacaaaaa ttaaactca tgtaaatcat gagggtaaga ctttctttgt actacctagt 4800
 gatgacacac tacgtagtga agctttcgag tactaccata ctcttgatga gagtttctt 4860
 ggtaggtaca tgtctgcttt aaaccacaca aagaaatgga aatttcctca agttggtggt 4920
 55 ttaacttcaa ttaaattggc tgataacaat tgttatttgt ctagtgtttt attagcactt 4980
 caacagcttg aagtcaaatt caatgcacca gcacttcaag aggcttatta tagagcccgt 5040

EP 1 694 829 B1

gctggtgatg ctgctaactt ttgtgactc atactcgctt acagtaataa aactgttggc 5100
 gagcttgggtg atgtcagaga aactatgacc catcttctac agcatgctaa tttggaatct 5160
 5 gcaaagcgag ttcttaatgt ggtgtgtaaa cattgtggtc agaaaactac taccttaacg 5220
 ggtgtagaag ctgtgatgta tatgggtact ctatcttatg ataatcttaa gacaggtggt 5280
 tccattccat gtgtgtgtgg tcgtgatgct acacaatatac tagtacaaca agagtcttct 5340
 10 tttgttatga tgtctgcacc acctgctgag tataaattac agcaaggtag attcttatgt 5400
 gcgaatgagt aactggtaa ctatcagtgt ggtcattaca ctcatataac tgctaaggag 5460
 accctctatc gtattgacgg agctcacctt acaaagatgt cagagtacaa aggaccagtg 5520
 15 actgatgttt tctacaagga aacatcttac actacaacca tcaagcctgt gtcgtataaa 5580
 ctcgatggag ttacttacac agagattgaa ccaaattgg atgggtatta taaaaggat 5640
 aatgcttact atacagagca gcctatagac cttgtaccaa ctcaaccatt accaaatgcg 5700
 20 agttttgata atttcaaaact cacatgttct aacacaaaat ttgctgatga tttaaatcaa 5760
 atgacaggct tcacaaagcc agcttcacga gagctatctg tcacattctt cccagacttg 5820
 aatggcgatg tagtggctat tgactataga cactattcag cgagtttcaa gaaagggtgct 5880
 25 aaattactgc ataagccaat tgtttggcac attaaccagg ctacaaccaa gacaacgttc 5940
 aaaccaaaaca cttggtgttt acgttgtctt tggagtacaa agccagtaga tacttcaaat 6000
 tcatttgaag ttctggcagt agaagacaca caaggaatgg acaatcttgc ttgtgaaagt 6060
 30 caacaaccca cctctgaaga agtagtggaa aatcctacca tacagaagga agtcatagag 6120
 tgtgacgtga aaactaccga agttgtaggc aatgtcatac ttaaaccatc agatgaagggt 6180
 gttaaagtaa cacaaagagt aggtcatgag gatcttatgg ctgcttatgt ggaaaacaca 6240
 35 agcattacca ttaagaaacc taatgagctt tcactagcct taggtttaaa aacaattgcc 6300
 actcatggta ttgctgcaat taatagtgtt ccttggagta aaattttggc ttatgtcaaa 6360
 ccattcttag gacaagcagc aattacaaca tcaaattgcg ctaagagatt agcacaacgt 6420
 40 gtgtttaaca attatatgcc ttatgtgttt acattattgt tccaattgtg tacttttact 6480
 aaaagtacca attctagaat tagagcttca ctacctaca ctattgctaa aatagtgtt 6540
 aagagtgttg ctaaattatg tttggatgcc ggcattaatt atgtgaagtc acccaaattt 6600
 45 tctaaattgt tcacaatcgc tatgtggcta ttgttgtaa gtatttgctt aggttctcta 6660
 atctgtgtaa ctgctgcttt tgggtgactc ttatctaatt ttggtgctcc ttcttattgt 6720
 aatggcgtta gagaattgta tcttaattcg tctaacgtta ctactatgga tttctgtgaa 6780
 50 ggttcttttc cttgcagcat ttgtttaagt ggattagact cccttgattc ttatccagct 6840
 cttgaaacca ttcagggtgac gatttcatcg tacaagctag acttgacaat tttagggtctg 6900
 gccgctgagt gggttttggc atatatgttg ttcacaaaat tcttttattt attaggtctt 6960
 55 tcagctataa tgcagggtgtt ctttggctat tttgctagtc atttcatcag caattcttgg 7020
 ctcatgtggt ttatcattag tattgtacaa atggcaccg tttctgcaat ggtaggatg 7080

EP 1 694 829 B1

	tacatcttct	ttgcttcttt	ctactacata	tggaagagct	atgttcatat	catggatggt	7140
	tgcacctctt	cgacttgcat	gatgtgctat	aagcgcaatc	gtgccacacg	cgttgagtgt	7200
5	acaactattg	ttaatggcat	gaagagatct	ttctatgtct	atgcaaatgg	aggccgtggc	7260
	ttctgcaaga	ctcacaattg	gaattgtctc	aattgtgaca	cattttgcac	tggtagtaca	7320
	ttcattagtg	atgaagttgc	tcgtgatttg	tcactccagt	ttaaaagacc	aatcaaccct	7380
10	actgaccagt	catcgtatat	tgttgatagt	gttgctgtga	aaaatggcgc	gcttcacctc	7440
	tactttgaca	aggctgggtca	aaagacctat	gagagacatc	cgctctccca	ttttgtcaat	7500
	ttagacaatt	tgagagctaa	caacactaaa	ggttcactgc	ctattaatgt	catagttttt	7560
15	gatggcaagt	ccaatgcca	cgagtctgct	tctaagtctg	cttctgtgta	ctacagtcag	7620
	ctgatgtgcc	aacctattct	gttgcttgac	caagctcttg	tatcagacgt	tggagatagt	7680
	actgaagttt	ccgttaagat	gtttgatgct	tatgtcgaca	ccttttcagc	aacttttagt	7740
20	gttcctatgg	aaaaacttaa	ggcacttggt	gctacagctc	acagcgagtt	agcaaagggt	7800
	gtagctttag	atggtgtcct	ttctacattc	gtgtcagctg	cccgacaagg	tgttgttgat	7860
	accgatgttg	acacaaagga	tgttattgaa	tgtctcaaac	tttcacatca	ctctgactta	7920
25	gaagtgacag	gtgacagttg	taacaatttc	atgctcacct	ataataaggt	tgaaaacatg	7980
	acgcccagag	atcttggcgc	atgtattgac	tgtaatgcaa	ggcatatcaa	tgcccaagta	8040
	gcaaaaagtc	acaatgtttc	actcatctgg	aatgtaaaag	actacatgtc	tttatctgaa	8100
30	cagctgcgta	aacaaattcg	tagtgctgcc	aagaagaaca	acataccttt	tagactaact	8160
	tgtgctacaa	ctagacaggt	tgtcaatgtc	ataactacta	aaatctcact	caagggtggt	8220
	aagattgtta	gtacttgttt	taaacttatg	cttaaggcca	cattattgtg	cgttcttgct	8280
35	gcattggttt	gttatatcgt	tatgccagta	catacattgt	caatccatga	tggttacaca	8340
	aatgaaatca	ttggttacaa	agccattcag	gatgggtgca	ctcgtgacat	catttctact	8400
	gatgattggt	ttgcaaataa	acatgctggt	tttgacgcat	ggtttagcca	gcgtggtggt	8460
40	tcatacaaaa	atgacaaaag	ctgccctgta	gtagctgcta	tcattacaag	agagattggt	8520
	ttcatagtg	ctggcttacc	gggtactgtg	ctgagagcaa	tcaatgggtga	cttcttgcat	8580
	tttctacctc	gtgttttttag	tgctgttggc	aacatttgct	acacaccttc	caaactcatt	8640
45	gagtatagtg	atthttgctac	ctctgcttgc	gttcttgctg	ctgagtgtag	aatthtttaag	8700
	gatgctatgg	gcaaacctgt	gccatattgt	tatgacacta	atthttgctaga	gggttctatt	8760
	tcttatagtg	agcttcgtcc	agacactcgt	tatgtgctta	tggttggttc	catcatacag	8820
50	tttcctaaca	cttacctgga	gggttctggt	agagtagtaa	caactthttga	tgctgagtac	8880
	tgtagacatg	gtacatgcga	aaggtcagaa	gtaggtatth	gcctatctac	cagtggtaga	8940
	tgggttctta	ataatgagca	ttacagagct	ctatcaggag	thttctgtgg	tgttgatg	9000
55	atgaatctca	tagctaacat	ctthtactcct	ctthgtgcaac	ctgthgggtgc	thtagatg	9060
	tctgcttcag	tagthggctgg	thgtattatt	gccatattgg	thactthgtgc	thcctactac	9120

EP 1 694 829 B1

tttatgaaat tcagacgtgt ttttgggtgag tacaaccatg ttgttgctgc taatgcactt 9180
 ttgtttttga tgtctttcac tatactctgt ctggtaccag cttacagctt tctgccggga 9240
 5 gtctactcag tcttttactt gtacttgaca ttctatttca ccaatgatgt ttcattcttg 9300
 gctcaccttc aatggtttgc catgttttct cctattgtgc ctttttggat aacagcaatc 9360
 tatgtattct gtatttctct gaagcactgc cattggttct ttaacaacta tcttaggaaa 9420
 10 agagtcatgt ttaatggagt tacatttagt accttcgagg aggctgcttt gtgtaccttt 9480
 ttgctcaaca aggaaatgta cctaaaattg cgtagcgaga cactgttgcc acttacacag 9540
 tataacaggt atcttgctct atataacaag tacaagtatt tcagtggagc cttagatact 9600
 15 accagctatc gtgaagcagc ttgctgccac tttagcaaagg ctctaaatga ctttagcaac 9660
 tcaggtgctg atgttctcta ccaaccacca cagacatcaa tcacttctgc tgttctgcag 9720
 agtggtttta ggaaaatggc attcccgtca ggcaaagttg aagggtgcat ggtacaagta 9780
 20 acctgtggaa ctacaactct taatggattg tggttggatg acacagtata ctgtccaaga 9840
 catgtcattt gcacagcaga agacatgctt aatcctaact atgaagatct gctcattcgc 9900
 aatccaacc atagctttct tgttcaggct ggcaatgttc aacttcgtgt tattggccat 9960
 25 tctatgcaaa attgtctgct taggcttaaa gttgatactt ctaaccctaa gacacccaag 10020
 tataaatttg tccgtatcca acctgggtcaa acattttcag ttctagcatg ctacaatggg 10080
 tcaccatctg gtgtttatca gtgtgccatg agacctaatc ataccattaa aggttctttc 10140
 30 cttaatggat catgtggtag tgttggtttt aacattgatt atgattgcgt gtctttctgc 10200
 tatatgcatc atatggagct tccaacagga gtacacgctg gtactgactt agaaggtaaa 10260
 ttctatggtc catttgttga cagacaaact gcacaggctg caggtacaga cacaaccata 10320
 35 acattaatg ttttggcatg gctgtatgct gctgttatca atgggtgatag gtggtttctt 10380
 aatagattca cactacttt gaatgacttt aaccttgtgg caatgaagta caactatgaa 10440
 cctttgacac aagatcatgt tgacatattg ggacctcttt ctgctcaaac aggaattgcc 10500
 40 gtcttagata tgtgtgctgc tttgaaagag ctgctgcaga atgggtatgaa tggtcgtact 10560
 atccttggta gcaactttt agaagatgag ttacacatc ttgatgttgt tagacaatgc 10620
 tctgggtgta cttccaagg taagttcaag aaaattgta agggcactca tcattggatg 10680
 45 cttttaactt tcttgacatc actattgatt cttgttcaaa gtacacagtg gtcactgttt 10740
 ttctttgttt acgagaatgc tttcttgcca ttactcttg gtattatggc aattgctgca 10800
 tgtgctatgc tgcttgttaa gcataagcac gcattcttgt gcttgtttct gttaccttct 10860
 50 cttgcaacag ttgcttactt taatatggtc tacatgcctg ctagctgggt gatgcgtatc 10920
 atgacatggc ttgaattggc tgacactagc ttgtctgggt ataggcttaa ggattgtggt 10980
 atgtatgctt cagcttttagt tttgcttatt ctcatgacag ctcgactgt ttatgatgat 11040
 55 gctgctagac gtgtttggac actgatgaat gtcattacac ttgtttacaa agtctactat 11100
 ggtaatgctt tagatcaagc tatttccatg tgggccttag ttatttctgt aacctctaac 11160

EP 1 694 829 B1

tattctggtg tcgttacgac tatcatgttt ttagctagag ctatagtgtt tgtgtgtgtt 11220
 gagtattacc cattgttatt tattactggc aacaccttac agtgtatcat gcttgtttat 11280
 5 tgtttccttag gctattgttg ctgctgctac tttggccttt tctgtttact caaccgttac 11340
 ttcaggctta ctcttgggtg ttatgactac ttggctctca cacaagaatt taggtatatg 11400
 aactcccagg ggcttttgcc tcctaagagt agtattgatg ctttcaagct taacattaag 11460
 10 ttgttgggta ttggaggtaa accatgtatc aagggtgcta ctgtacagtc taaaatgtct 11520
 gacgtaaagt gcacatctgt ggtactgctc tcggttcttc aacaacttag agtagagtca 11580
 tcttctaaat tgtgggcaca atgtgtacaa ctccacaatg atattcttct tgcaaaagac 11640
 15 acaactgaag ctttcgagaa gatggtttct cttttgtctg ttttgctatc catgcagggt 11700
 gctgtagaca ttaatagggt gtgcgaggaa atgctcgata accgtgctac tcttcaggct 11760
 attgcttcag aatttagttc tttaccatca tatgccgctt atgccactgc ccaggaggcc 11820
 20 tatgagcagg ctgtagctaa tgggtgattct gaagtcgttc tcaaaaagtt aaagaaatct 11880
 ttgaatgtgg ctaaactctga gtttgaccgt gatgctgcca tgcaacgcaa gttggaaaag 11940
 atggcagatc aggctatgac ccaaagtac aaacaggcaa gatctgagga caagagggca 12000
 25 aaagtaacta gtgctatgca aacaatgctc ttcactatgc ttaggaagct tgataatgat 12060
 gcacttaaca acattatcaa caatgcgctg gatggttgtg ttccactcaa catcatacca 12120
 ttgactacag cagccaaact catggttgtt gtccctgatt atggtaccta caagaacact 12180
 30 tgtgatggta acacctttac atatgcatct gcaactctggg aaatccagca agttgttgat 12240
 gcggatagca agattgttca acttagtgaa attaacatgg acaattcacc aaatttggct 12300
 tggcctctta ttgttacagc tctaagagcc aactcagctg ttaaactaca gaataatgaa 12360
 35 ctgagtccag tagcactacg acagatgtcc tgtgctggctg gtaccacaca aacagcttgt 12420
 actgatgaca atgcacttgc ctactataac aattcgaagg gaggtagggt tgtgctggca 12480
 ttactatcag accaccaaga tctcaaagtg gctagattcc ctaagagtga tggtagaggt 12540
 40 acaatttaca cagaactgga accaccttgt aggtttgtta cagacacacc aaaagggcct 12600
 aaagtgaaat acttgtactt catcaaaggc ttaaacaacc taaatagagg tatggtgctg 12660
 ggcagtttag ctgctacagt acgtcttcag gctggaaatg ctacagaagt acctgccaat 12720
 45 tcaactgtgc tttccttctg tgcttttgca gtagaccctg ctaaagcata taaggattac 12780
 ctagcaagtg gaggacaacc aatcaccaac tgtgtgaaga tgttgtgtac acacactggg 12840
 acaggacagg caattactgt aacaccagaa gctaacatgg accaagagtc ctttgggtgg 12900
 50 gcttcatgtt gtctgtattg tagatgccac attgaccatc caaatcctaa aggattctgt 12960
 gacttgaaag gtaagtacgt ccaaatacct accacttgtg ctaatgacc agtggggttt 13020
 acacttagaa acacagtctg taccgtctgc ggaatgtgga aaggttatgg ctgtagttgt 13080
 55 gaccaactcc gcgaaccctt gatgcagtct gcggatgcat caacgttttt aaacgggttt 13140
 gcggtgtaag tgcagcccgt cttacaccgt gcggcacagg cactagtact gatgtcgtct 13200

EP 1 694 829 B1

acagggcttt tgatatttac aacgaaaaag ttgctggttt tgcaaagttc ctaaaaacta 13260
 attgctgtcg cttccaggag aaggatgagg aaggcaattt attagactct tactttgtag 13320
 5 ttaagaggca tactatgtct aactaccaac atgaagagac tatttataac ttggttaaag 13380
 attgtccagc gggtgctgtc catgactttt tcaagtttag agtagatggg gacatggtag 13440
 cacatatatc acgtcagcgt ctaactaaat acacaatggc tgatttagtc tatgctctac 13500
 10 gtcattttga tgagggtaat tgtgatacat taaaagaaat actcgtcaca tacaattgct 13560
 gtgatgatga ttatttcaat aagaaggatt ggtatgactt cgtagagaat cctgacatct 13620
 tacgctgata tgctaactta ggtgagcgtg tacgccaatc attattaaag actgtacaat 13680
 15 tctgctgatc tatgctgtat gcaggcattg taggcgtact gacattagat aatcaggatc 13740
 ttaatgggaa ctggtacgat ttcggtgatt tcgtacaagt agcaccaggc tgcggagttc 13800
 ctattgtgga ttcataattac tcattgctga tgccatcct cactttgact agggcattgg 13860
 20 ctgctgagtc ccatatggat gctgatctcg caaaaccact tattaagtgg gatttgctga 13920
 aatatgattt tacggaagag agactttgtc tcttcgaccg ttattttaa tattgggacc 13980
 agacatacca tccaattgt attaactgtt tggatgatag gtgtatcctt cattgtgcaa 14040
 25 actttaatgt gttattttct actgtgtttc cacctacaag ttttggacca ctagtaagaa 14100
 aaatatttgt agatgggtgtt ccttttgrtg tttcaactgg ataccatttt cgtgagttag 14160
 gagtcgtaca taatcaggat gtaaacttac atagctcgcg tctcagttc aaggaacttt 14220
 30 tagtgtatgc tgctgatcca gctatgcatg cagcttctgg caatttattg ctagataaac 14280
 gcactacatg cttttcagta gctgcactaa caaacaatgt tgcttttcaa actgtcaaac 14340
 ccggaattt taataaagac ttttatgact ttgctgtgtc taaaggttt ttaaggaag 14400
 35 gaagtctgt tgaactaaaa cacttcttct ttgctcagga tggcaacgct gctatcagtg 14460
 attatgacta ttatcgttat aatctgcaa caatgtgtga tatcagacaa ctctatttcg 14520
 tagttgaagt tgttgataaa tactttgatt gttacgatgg tggctgtatt aatgccaacc 14580
 40 aagtaatcgt taacaatctg gataaatcag ctggtttccc atttaataaa tggggtaagg 14640
 ctagacttta ttatgactca atgagttatg aggatcaaga tgcacttttc gcgtatacta 14700
 agcgtaatgt catccctact ataactcaa tgaatcttaa gtatgccatt agtgcaaaga 14760
 45 atagagctcg caccgtagct ggtgtctcta tctgtagtac tatgacaaat agacagtttc 14820
 atcagaaatt attgaagtca atagccgcca ctagaggagc tactgtggta attggaacaa 14880
 gcaagtttta cgggtggctgg cataatatgt taaaactgt ttacagtgat gtagaaactc 14940
 50 cacaccttat gggttgggat tatccaaaat gtgacagagc catgcctaac atgcttagga 15000
 taatggcctc tcttgttctt gctcgcaaac ataacttg ctgtaactta tcacaccggt 15060
 tctacagggt agctaacgag tgtgcaag tattaagtga gatggctatg tgtggcggct 15120
 55 cactatatgt taaaccaggt ggaacatcat ccggtgatgc tacaactgct tatgctaata 15180
 gtgtctttaa catttgcata gctgttacag ccaatgtaaa tgcacttctt tcaactgatg 15240

EP 1 694 829 B1

gtaataagat agctgacaag tatgtccgca atctacaaca caggctctat gagtgtctct 15300
 atagaaatag ggatgttgat catgaattcg tggatgagtt ttacgcttac ctgCGTAAAC 15360
 5 atttctccat gatgattcct tctgatgatg ccgttgtgtg ctataacagt aactatgCGG 15420
 ctcaaggttt agtagctagc attaagaact ttaaggcagt tctttattat caaaataatg 15480
 tgttcatgtc tgaggcaaaa tgttggactg agactgacct tactaaagga cctcacgaat 15540
 10 ttgctcaca gcatacaatg ctagttaaac aaggagatga ttacgtgtac ctgccttacc 15600
 cagatccatc aagaatatta ggcgCAGGCT gttttgtcga tgatattgtc aaaacagatg 15660
 gtacacttat gattgaaagg ttcgtgtcac tggctattga tgcttaccCa cttacaaaac 15720
 15 atcctaataca ggagtatgct gatgtctttc acttgtattt acaatacatt agaaagttac 15780
 atgatgagct tactggccac atgttggaca tgtattccgt aatgctaact aatgataaca 15840
 cctcacggta ctgggaacct gagttttatg aggctatgta cacaccacat acagtcttgc 15900
 20 aggctgtagg tgcttgtgta ttgtgcaatt cacagacttc acttcgttgc ggtgcctgta 15960
 ttaggagacc attcctatgt tgcaagtgct gctatgacca tgtcatttca acatcacaca 16020
 aattagtgtt gtctgttaat ccctatgttt gcaatgcccc aggttgtgat gtcactgatg 16080
 25 tgacacaact gtatctagga ggtatgagct attattgcaa gtcacataag cctcccatta 16140
 gttttccatt atgtgctaata ggtcaggttt ttggtttata caaaaacaca tgtgtaggca 16200
 gtgacaatgt cactgacttc aatgcgatag caacatgtga ttggactaat gctggcgatt 16260
 30 acatacttgc caacacttgt actgagagac tcaagctttt cgCAGCAGAA acgctcaaag 16320
 ccactgagga aacatttaag ctgtcatatg gtattgccac tgtacgcgaa gtactctctg 16380
 acagagaatt gcatctttca tgggaggttg gaaaacctag accaccattg aacagaaact 16440
 35 atgtctttac tggttaccgt gtaactaaaa atagtaaagt acagattgga gagtacacct 16500
 ttgaaaaagg tgactatggt gatgctgttg tgtacagagg tactacgaca tacaagttga 16560
 atgttggga ttactttgtg ttgacatctc aactgtaat gccacttagt gcacctactc 16620
 40 tagtgccaca agagcactat gtgagaatta ctggcttGTA cccaacactc aacatctcag 16680
 atgagttttc tagcaatggt gcaaattatc aaaaggtcgg catgcaaaag tactctacac 16740
 tccaaggacc acctggact ggtaagagtc attttgccat cggacttgct ctctattacc 16800
 45 catctgctcg catagtgtat acggcatgct ctcatgcagc tgttgatgcc ctatgtgaaa 16860
 aggcattaaa atatttgccc atagataaat gtagtagaat catacctgcg cgtgcgcgcg 16920
 tagagtgttt tgataaattc aaagtgaatt caacactaga acagtatgtt ttctgactg 16980
 50 taaatgcatt gccagaaaca actgctgaca ttgtagtctt tgatgaaatc tctatggctA 17040
 ctaattatga cttgagtgtt gtcaatgcta gacttcgtgc aaaacactac gtctatattg 17100
 gcgatcctgc tcaattacca gcccccgca cattgctgac taaaggcaca ctagaaccag 17160
 55 aatattttaa ttcagtgtgc agacttatga aaacaatagg tccagacatg ttccttggaa 17220
 cttgtcgcgg ttgtcctgct gaaattgttg aactgtgag tgcttttagtt tatgacaata 17280

EP 1 694 829 B1

agctaaaagc acacaaggat aagtcagctc aatgcttcaa aatgttctac aaaggtgtta 17340
 ttacacatga tgtttcatct gcaatcaaca gacctcaaat aggcgttgta agagaatttc 17400
 5 ttacacgcaa tcctgcttgg agaaaagctg tttttatctc accttataat tcacagaacg 17460
 ctgtagcttc aaaaatctta ggattgccta cgcagactgt tgattcatca cagggttctg 17520
 aatatgacta tgtcatattc acacaaacta ctgaaacagc aactcttgt aatgtcaacc 17580
 10 gcttcaatgt ggctatcaca agggcaaaaa ttggcatttt gtgcataatg tctgatagag 17640
 atctttatga caaactgcaa tttaacaagtc tagaaatacc acgtcgcaat gtggctacat 17700
 tacaagcaga aatgtaact ggacttttta aggactgtag taagatcatt actggctctc 17760
 15 atcctacaca ggcacctaca cacctcagcg ttgatataaa gttcaagact gaaggattat 17820
 gtgttgacat accaggcata ccaaaggaca tgacctaccg tagactcatc tctatgatgg 17880
 gtttcaaaat gaattaccaa gtcaatggtt accctaatat gtttatcacc cgcaagaag 17940
 20 ctattcgtca cgttcgtgcg tggattggct ttgatgtaga gggctgtcat gcaactagag 18000
 atgctgtggg tactaaccta cctctccagc taggattttc tacagggtgtt aacttagtag 18060
 ctgtaccgac tggttatggt gacactgaaa ataacacaga attcaccaga gttaatgcaa 18120
 25 aacctccacc aggtgaccag tttaaacatc ttataccact catgtataaa ggcttgcctt 18180
 ggaatgtagt gcgtattaag atagtacaaa tgctcagtga tacctgaaa ggattgtcag 18240
 acagagtcgt gttcgtcctt tgggcgcatg gctttgagct tacatcaatg aagtactttg 18300
 30 tcaagattgg acctgaaaga acgtgttgtc tgtgtgacaa acgtgcaact tgcttttcta 18360
 cttcatcaga tacttatgcc tgctggaatc attctgtggg ttttgactat gtctataacc 18420
 ctttatgat tgatgttcag cagtggggct ttacgggtaa cttcagagt aaccatgacc 18480
 35 aacattgcca ggtacatgga aatgcacatg tggctagttg tgatgctatc atgactagat 18540
 gtttagcagt ccatgagtgc tttgttaagc gcgttgattg gtctgttgaa taccctatta 18600
 taggagatga actgagggtt aattctgctt gcagaaaagt acaacacatg gttgtgaagt 18660
 40 ctgcattgct tgctgataag tttccagttc ttcattgacat tggaaatcca aaggctatca 18720
 agtgtgtgcc tcaggctgaa gtagaatgga agttctacga tgctcagcca tgtagtgaca 18780
 aagcttacia aatagaggaa ctcttctatt cttatgctac acatcacgat aaattcactg 18840
 45 atggtgtttg tttgttttgg aattgtaacg ttgatcgta cccagccaat gcaattgtgt 18900
 gtaggtttga cacaagagtc ttgtcaaact tgaacttacc aggctgtgat ggtggtagtt 18960
 tgtatgtgaa taagcatgca ttccacactc cagctttcga taaaagtgca tttactaatt 19020
 50 taaagcaatt gcctttcttt tactattctg atagtccttg tgagtctcat ggcaacaag 19080
 tagtgtcgga tattgattat gttccactca aatctgctac gtgtattaca cgatgcaatt 19140
 taggtggtgc tgtttgcaga caccatgcaa atgagtaccg acagtacttg gatgcatata 19200
 55 atatgatgat ttctgctgga tttagcctat ggatttacia acaatttgat acttataacc 19260
 tgtggaatac atttaccagg ttacagagtt tagaaaatgt ggcttataat gttgttaata 19320

EP 1 694 829 B1

aaggacactt tgatggacac gccggcgaag cacctgtttc catcattaat aatgctgttt 19380
 acacaaaggt agatgggtatt gatgtggaga tctttgaaaa taagacaaca cttcctgtta 19440
 5 atgttgcat tggagctttgg gctaagcgta acattaaacc agtgccagag attaagatac 19500
 tcaataat tgggtgttgat atcgctgcta atactgtaat ctgggactac aaaagagaag 19560
 cccagcaca tgtatctaca ataggtgtct gcacaatgac tgacattgcc aagaaacct 19620
 10 ctgagagtgc ttgttcttca cttactgtct tgtttgatgg tagagtggaa ggacaggtag 19680
 accttttag aaacgcccgt aatgggtgttt taataacaga aggttcagtc aaaggtctaa 19740
 caccttcaa gggaccagca caagctagcg tcaatggagt cacattaatt ggagaatcag 19800
 15 taaaaacaca gtttaactac ttttaagaaag tagacggcat tattcaacag ttgcctgaaa 19860
 cctactttac tcagagcaga gacttagagg attttaagcc cagatcacia atggaaactg 19920
 actttctcga gctcgctatg gatgaattca tacagcgata taagctcgag ggctatgcct 19980
 20 tcgaacacat cgtttatgga gatttcagtc atggacaact tggcggctct catttaatga 20040
 taggccttagc caagcgctca caagattcac cacttaaatt agaggatttt atccctatgg 20100
 acagcacagt gaaaaattac ttcataacag atgcycaaac aggttcatca aatgtgtgt 20160
 25 gttctgtgat tgatctttta cttgatgact ttgtcgagat aataaagtca caagatttgt 20220
 cagtgat ttc aaaagtggc aaggttaca ttgactatgc tgaaatttca ttcattgcttt 20280
 ggtgtaagga tggacatgtt gaaaccttct acccaaaact acaagcaagt caagcgtggc 20340
 30 aaccaggtgt tgcgatgcct aacttgta caagtgcaaag aatgcttctt gaaaagtgtg 20400
 accttcagaa ttatggtgaa aatgctgtta taccaaaagg aataatgatg aatgtcga 20460
 agtatactca actgtgtcaa tacttaata cacttacttt agctgtacct tacaacatga 20520
 35 gagttattca ctttgggtgct ggctctgata aaggagttgc accaggtaca gctgtgctca 20580
 gacaatgggt gcccaactggc aactacttg tcgattcaga tcttaatgac ttcgtctccg 20640
 acgcagattc tactttaatt ggagactgtg caacagtaca tacggcta ataatgggacc 20700
 40 ttattattag cgatatgtat gaccctagga ccaaacatgt gacaaaagag aatgactcta 20760
 aagaaggggt tttcacttat ctgtgtggat ttataaagca aaaactagcc ctgggtgggt 20820
 ctatagctgt aaagataaca gagcattctt ggaatgctga cttttacaag cttatgggcc 20880
 45 atttctcatg gtggacagct tttgttaca atgtaaatgc atcatcatcg gaagcatttt 20940
 taattggggc taactatctt ggcaagccga aggaacaaat tgatggctat accatgcatg 21000
 ctaactacat tttctggagg aacacaaatc ctatccagtt gtcttcctat tcactctttg 21060
 50 acatgagcaa atttcctctt aaattaagag gaactgctgt aatgtctctt aaggagaatc 21120
 aatcaatga tatgatttat tctcttctgg aaaaaggtag gcttatcatt agagaaaaca 21180
 acagagttgt ggtttcaagt gatattcttg ttaacaacta a 21221

55 <210> 32
 <211> 297
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

EP 1 694 829 B1

<400> 32

atggaccca atcaaacca cgtagtgccc cccgcattac atttgggtgga cccacagatt 60
 5 caactgacaa taaccagaat ggaggacgca atggggcaag gccaaaacag cgccgacccc 120
 aaggtttacc caataatact gcgtcttggg tcacagctct cactcagcat ggcaaggagg 180
 aacttagatt ccctcgaggc cagggcgttc caatcaacac caatagtggg ccagatgacc 240
 10 aaattggcta ctaccgaaga gctacccgac gagttcgtgg tggtgacggc aaaatga 297

<210> 33

<211> 98

15 <212> PRT

<213> CORONAVIRUS

<400> 33

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

<210> 34

45 <211> 213

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

<400> 34

50 atgctgccac cgtgctacaa cttcctcaag gaacaacatt gccaaaaggc ttctacgcag 60
 agggaagcag aggcggcagt caagcctctt ctcgctcctc atcacgtagt cgcggtaatt 120
 55 caagaaattc aactcctggc agcagtaggg gaaattctcc tgctcgaatg gctagcggag 180
 gtgggtgaaac tgccctcgcg ctattgctgc tag 213

EP 1 694 829 B1

<210> 35
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS

5

<400> 35

10 Met Leu Pro Pro Cys Tyr Asn Phe Leu Lys Glu Gln His Cys Gln Lys
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Gln Arg Glu Ala Glu Ala Ala Val Lys Pro Leu Leu Ala
 20 25 30

15

Pro His His Val Val Ala Val Ile Gln Glu Ile Gln Leu Leu Ala Ala
 35 40 45

20

Val Gly Glu Ile Leu Leu Leu Glu Trp Leu Ala Glu Val Val Lys Leu
 50 55 60

Pro Ser Arg Tyr Cys Cys
 65 70

25

<210> 36
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (67)..(1335)
 <223>

35

<400> 36

40 atgaagggtca ccaaactgct gcatttagag acgtacttgt tgttttaaataaacgaacaa 60
 attaaa atg tct gat aat gga ccc caa tca aac caa cgt agt gcc ccc 108

45

50

55

EP 1 694 829 B1

	Met	Ser	Asp	Asn	Gly	Pro	Gln	Ser	Asn	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro			
	1				5					10							
5	cgc Arg 15	att Ile	aca Thr	ttt Phe	ggt Gly	gga Gly 20	ccc Pro	aca Thr	gat Asp	tca Ser	act Thr 25	gac Asp	aat Asn	aac Asn	cag Gln	aat Asn 30	156
	gga Gly	gga Gly	cgc Arg	aat Asn	ggg Gly 35	gca Ala	agg Arg	cca Pro	aaa Lys	cag Gln 40	cgc Arg	cga Arg	ccc Pro	caa Gln	ggt Gly 45	tta Leu	204
10	ccc Pro	aat Asn	aat Asn	act Thr 50	gcg Ala	tct Ser	tgg Trp	ttc Phe	aca Thr 55	gct Ala	ctc Leu	act Thr	cag Gln	cat His 60	ggc Gly	aag Lys	252
15	gag Glu	gaa Glu	ctt Leu 65	aga Arg	ttc Phe	cct Pro	cga Arg	ggc Gly 70	cag Gln	ggc Gly	ggt Val	cca Pro	atc Ile 75	aac Asn	acc Thr	aat Asn	300
	agt Ser	ggt Gly 80	cca Pro	gat Asp	gac Asp	caa Gln	att Ile 85	ggc Gly	tac Tyr	tac Tyr	cga Arg	aga Arg	gct Ala	acc Thr	cga Arg	cga Arg	348
20	ggt Val 95	cgt Arg	ggt Gly	ggt Gly	gac Asp	ggc Gly 100	aaa Lys	atg Met	aaa Lys	gag Glu	ctc Leu 105	agc Ser	ccc Pro	aga Arg	tgg Trp	tac Tyr 110	396
25	ttc Phe	tat Tyr	tac Tyr	cta Leu	gga Gly 115	act Thr	ggc Gly	cca Pro	gaa Glu	gct Ala 120	tca Ser	ctt Leu	ccc Pro	tac Tyr	ggc Gly 125	gct Ala	444
	aac Asn	aaa Lys	gaa Glu	ggc Gly 130	atc Ile	gta Val	tgg Trp	ggt Val	gca Ala 135	act Thr	gag Glu	gga Gly	gcc Ala	ttg Leu 140	aat Asn	aca Thr	492
30	ccc Pro	aaa Lys	gac Asp 145	cac His	att Ile	ggc Gly	acc Thr	cgc Arg 150	aat Asn	cct Pro	aat Asn	aac Asn	aat Asn 155	gct Ala	gcc Ala	acc Thr	540
35	gtg Val 160	cta Leu	caa Gln	ctt Leu	cct Pro	caa Gln	gga Gly 165	aca Thr	aca Thr	ttg Leu	cca Pro	aaa Lys 170	ggc Gly	ttc Phe	tac Tyr	gca Ala	588
	gag Glu 175	gga Gly	agc Ser	aga Arg	ggc Gly 180	ggc Gly	agt Ser	caa Gln	gcc Ala	tct Ser	tct Ser	cgc Arg	tcc Ser	tca Ser	tca Ser	cgt Arg 190	636
40	agt Ser	cgc Arg	ggt Gly	aat Asn	tca Ser 195	aga Arg	aat Asn	tca Ser	act Thr	cct Pro 200	ggc Gly	agc Ser	agt Ser	agg Arg	gga Gly 205	aat Asn	684
45	tct Ser	cct Pro	gct Ala	cga Arg 210	atg Met	gct Ala	agc Ser	gga Gly	ggt Gly 215	ggt Gly	gaa Glu	act Thr	gcc Ala	ctc Leu 220	gcg Ala	cta Leu	732
	ttg Leu	ctg Leu	cta Leu 225	gac Asp	aga Arg	ttg Leu	aac Asn	cag Gln 230	ctt Leu	gag Glu	agc Ser	aaa Lys	gtt Val 235	tct Ser	ggt Gly	aaa Lys	780
50	ggc Gly 240	caa Gln	caa Gln	caa Gln	caa Gln	ggc Gly 245	caa Gln	act Thr	gtc Val	act Thr	aag Lys	aaa Lys 250	tct Ser	gct Ala	gct Ala	gag Glu	828
55	gca Ala 255	tct Ser	aaa Lys	aag Lys	cct Pro	cgc Arg 260	caa Gln	aaa Lys	cgt Arg	act Thr	gcc Ala 265	aca Thr	aaa Lys	cag Gln	tac Tyr	aac Asn 270	876
	gtc	act	caa	gca	ttt	ggg	aga	cgt	ggt	cca	gaa	caa	acc	caa	gga	aat	924

EP 1 694 829 B1

Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn
275 280 285

5 ttc ggg gac caa gac cta atc aga caa gga act gat tac aaa cat tgg 972
Phe Gly Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp
290 300

10 ccg caa att gca caa ttt gct cca agt gcc tct gca ttc ttt gga atg 1020
Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met
305 310 315

tca cgc att ggc atg gaa gtc aca cct tcg gga aca tgg ctg act tat 1068
Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr
320 325 330

15 cat gga gcc att aaa ttg gat gac aaa gat cca caa ttc aaa gac aac 1116
His Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn
335 340 345 350

20 gtc ata ctg ctg aac aag cac att gac gca tac aaa aca ttc cca cca 1164
Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro
355 360 365

aca gag cct aaa aag gac aaa aag aaa aag act gat gaa gct cag cct 1212
Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro
370 375 380

25 ttg ccg cag aga caa aag aag cag ccc act gtg act ctt ctt cct gcg 1260
Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala
385 390 395

30 gct gac atg gat gat ttc tcc aga caa ctt caa aat tcc atg agt gga 1308
Ala Asp Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly
400 405 410

gct tct gct gat tca act cag gca taa acactcatga tgaccacaca 1355
Ala Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala

415 420

35 aggcagatgg gctatgtaaa cg 1377

<210> 37
<211> 422
40 <212> PRT
<213> CORONAVIRUS

<400> 37

45 Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
1 5 10 15

50 Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
35 40 45

55 Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
50 55 60

EP 1 694 829 B1

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

EP 1 694 829 B1

Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile
 340 345 350
 5
 Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu
 355 360 365
 10
 Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro
 370 375 380
 Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp
 385 390 395 400
 15
 Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser
 405 410 415
 20
 Ala Asp Ser Thr Gln Ala
 420

<210> 38
 <211> 1377
 25 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 <400> 38

30 atgaagggtca ccaaactgct gcatttagag acgtacttgt tgttttaaat aaacgaacaa 60
 attaaaatgt ctgataatgg accccaatca aaccaacgta gtgcccccg cattacattt 120
 ggtggaccga cagattcaac tgacaataac cagaatggag gacgcaatgg ggcaaggcca 180
 35 aaacagcgcc gacccaagg tttacccaat aatactgcgt cttggttcac agctctcact 240
 cagcatggca aggaggaact tagattccct cgaggccagg gcgttccaat caacaccaat 300
 agtgggtccag atgaccaaat tggctactac cgaagagcta cccgacgagt tcgtgggtgt 360
 40 gacggcaaaa tgaaagagct cagccccaga tggctacttct attacctagg aactggccca 420
 gaagcttcac ttccctacgg cgctaacaaa gaaggcatcg tatggggttc aactgagggga 480
 gccttgaata cacccaaga ccacattggc acccgcaatc ctaataacaa tgctgccacc 540
 45 gtgctacaac ttcctcaagg aacaacattg ccaaaaggct tctacgcaga gggaagcaga 600
 ggcggcagtc aagcctcttc tcgctcctca tcacgtagtc gcggttaattc aagaaattca 660
 actcctggca gcagtagggg aaattctct gctcgaatgg ctacgggagg tggtgaaact 720
 50 gccctcgcgc tattgctgct agacagattg aaccagcttg agagcaaagt ttctggtaaa 780
 ggccaacaac aacaaggcca aactgtcact aagaaatctg ctgctgaggc atctaaaaag 840
 cctcgccaaa aacgtactgc cacaaaacag tacaacgtca ctcaagcatt tgggagacgt 900
 55 ggtccagaac aaaccaagg aaatttcggg gaccaagacc taatcagaca aggaactgat 960

EP 1 694 829 B1

	tacaaacatt ggccgcaaat tgcacaattt gctccaagtg cctctgcatt ctttggaatg	1020
	tcacgcattg gcatggaagt cacaccttcg ggaacatggc tgacttatca tggagccatt	1080
5	aaattggatg acaaagatcc acaattcaaa gacaacgtca tactgctgaa caagcacatt	1140
	gacgcataca aaacattccc accaacagag cctaaaaagg acaaaaagaa aaagactgat	1200
	gaagctcagc ctttgccgca gagacaaaag aagcagccca ctgtgactct tcttcctgcg	1260
10	gctgacatgg atgattttctc cagacaactt caaaattcca tgagtggagc ttctgctgat	1320
	tcaactcagg cataaacact catgatgacc acacaaggca gatgggctat gtaaacg	1377
15	<210> 39	
	<211> 204	
	<212> DNA	
	<213> CORONAVIRUS	
20	<400> 39	
	atattaggtt tttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctggt	60
	ctctaaacga actttaaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcattgccta gtgcacctac	120
25	gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tcgtccctct	180
	tctgcagact gcttacgggt tcgt	204
30	<210> 40	
	<211> 809	
	<212> DNA	
	<213> CORONAVIRUS	
35	<400> 40	
	actcaagcat ttgggagacg tgggtccagaa caaacccaag gaaatttcgg ggaccaagac	60
	ctaatacagac aaggaactga ttacaaacat tggccgcaaa ttgcacaatt tgctccaagt	120
40	gcctctgcat tctttggaat gtcacgcatt ggcatggaag tcacaccttc gggaacatgg	180
	ctgacttatac atggagccat taaattggat gacaaagatc cacaattcaa agacaacgtc	240
	atactgctga acaagcacat tgacgcatac aaaacattcc caccaacaga gcctaaaaag	300
45	gacaaaaaga aaaagactga tgaagctcag cctttgccgc agagacaaaa gaagcagccc	360
	actgtgactc tcttcctgctc ggctgacatg gatgatttct ccagacaact tcaaaattcc	420
	atgagtggag cttctgctga ttcaactcag gcataaacac tcatgatgac cacacaaggc	480
50	agatgggcta tgtaaacggt ttcgcaattc cgtttacgat acatagtcta ctcttgctga	540
	gaatgaattc tcgtaactaa acagcacaag taggtttagt taactttaat ctcatatagc	600
55	aatctttaat caatgtgtaa cattagggag gacttgaaag agccaccaca ttttcatcga	660

EP 1 694 829 B1

ggccacgCGG agtacgatCG agggTACagT gaataatgct agggagagct gcctatatgg 720
aagagcccta atgtgtaaaa ttaattttag tagtgctatc cccatgtgat ttaataagct 780
5 tcttaggaga atgacaaaa aaaaaaaaa 809

<210> 41
<211> 448
10 <212> DNA
<213> CORONAVIRUS
<400> 41

15 aatgaacaca tagggctgTt caagctgggg cagtacgcct ttttccagct ctactagacc 60
acaagtGCCa tttttgaggt gttcacgtgc ctccgatagg gcctcttcca cagagtcccc 120
gaagccacgc actagcacgt ctctaacctg aaggacaggc aaactgagtt ggacgtgtgt 180
20 tttctcgTtG acaccaagaa caaggctctc catcttacct ttcggtcaca cccggacgaa 240
acctaggTat gctgatgatc gactgcaaca cggacgaaac cgtaagcagT ctgcagaaga 300
gggacgagtt actcgtttct tgtcaacgac agtaaaattt attattgttt atactgcgta 360
25 ggtgcactag gcatgcagcc gagcgacagc tacacagatt ttaaagttcg tttagagaac 420
agatctaaa gagatcgagg ttggttgg 448

30 <210> 42
<211> 2033
<212> DNA
<213> CORONAVIRUS
35 <400> 42

atacctaggT ttcgtccggg tgtgaccgaa aggtaagatg gagagccttg ttcttggtgt 60
40 caacgagaaa acacacgtcc aactcagttt gcctgtcctt caggTtagag acgtgctagt 120
gcgtggcttc ggggactctg tggaagaggc cctatcggag gcacgtgaac acctcaaaaa 180
tggcactTgt ggtctagtag agctggaaaa aggcgtactg cccagcttg aacagcccta 240
45 tgtgttcatt aaacgttctg atgccttaag caccaatcac ggccacaagg tcgttgagct 300
ggtTgcagaa atggacggca ttcagtacgg tcgtagcggT ataactctgg gagtactcgt 360
gccacatgtg ggcgaaacct caattgcata ccgcaatgtt cttcttcgta agaacggtaa 420
50 taagggagcc ggtggTcata gctatggcat cgatctaaag tcttatgact taggtgacga 480
gctTggcact gatcccattg aagattatga acaaaaactgg aactactaagc atggcagTgg 540
tgcactccgt gaactcactc gtgagctcaa tggaggtgca gtcactcgct atgtcgaaa 600
55 caatttctgt ggcccagatg ggtaccctct tgattgcatc aaagattttc tcgcacgcgc 660

EP 1 694 829 B1

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

gggcaagtca atgtgcactc tttccgaaca acttgattac atcgagtcga agagaggtgt 720
 ctactgctgc cgtgaccatg agcatgaaat tgcctggttc actgagcgcct ctgataagag 780
 ctacgagcac cagacaccct tcgaaattaa gagtgccaag aaatttgaca ctttcaaagg 840
 ggaatgccca aagtttgtgt ttcctcttaa ctcaaaagtc aaagtcattc aaccacgtgt 900
 tghaaagaaa aagactgagg gtttcatggg gcgtatacgc tctgtgtacc ctgttgcac 960
 tccacaggag tgtaacaata tgcacttgtc taccttgatg aaatgtaatc attgcatga 1020
 agtttcatgg cagacgtgcg actttctgaa agccacttgt gaacattgtg gcactgaaaa 1080
 tttagtatt gaaggaccta ctacatgtgg gtacctact actaatgctg tagtgaaaat 1140
 gccatgtcct gcctgtcaag acccagagat tggacctgag catagtgttg cagattatca 1200
 caaccactca aacattgaaa ctcgactccg caagggagggt aggactagat gttttggagg 1260
 ctgtgtgttt gcctatgttg gctgctataa taagcgtgcc tactgggttc ctcgtgctag 1320
 tgctgatatt ggctcaggcc aacttggcat tactggtgac aatgtggaga cttgaaatga 1380
 ggatctcctt gagatactga gtcgtgaacg tgtaaacatt aacattgttg gcgattttca 1440
 tttgaaatgaa gaggttgcca tcattttggc atctttctct gcttctacaa gtgcctttat 1500
 tgacactata aagagtcttg attacaagtc tttcaaaacc attgttgagt cctgcggtaa 1560
 ctataaagtt accaagggaa agcccgtaaa aggtgcttgg aacattggac aacagagatc 1620
 agttttaaca cactgtgtg gttttccctc acaggctgct ggtgttatca gatcaatttt 1680
 tgcgcgca ca cttgatgcag caaaccactc aattcctgat ttgcaaagag cagctgtcac 1740
 cataactgat ggtatttctg aacagtcatt acgtcttgtc gacgccatgg tttatacttc 1800
 agacctgctc accaacagtg tcattattat ggcataatga actggtggtc ttgtacaaca 1860
 gacttctcag tggttgctta atcttttggg cactactgtt gaaaaactca ggcctatctt 1920
 tgaatggatt gaggcgaaac ttagtgcagg agttgaattt ctcaaggatg cttgggagat 1980
 tctcaaattt ctattacag gtgttttga catcgtcaag ggtcaaatac agg 2033

<210> 43
 <211> 2018
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

<400>

ggattgaggc gaaacttagt gcaggagttg aatttctcaa ggatgcttgg gagattctca 60
 aatttctcat tacagggtgtt tttgacatcg tcaagggcca aatacagggt gcttcagata 120
 acatcaagga ttgtgtaaaa tgcttcattg atgttgtaaa caaggcactc gaaatgtgca 180
 ttgatcaagt cactatcgct ggcgcaaagt tgcgatcact caacttaggt gaagtcttca 240
 tcgctcaaag caagggactt taccgtcagt gtatacgtgg caaggagcag ctgcaactac 300

EP 1 694 829 B1

tcatgcctct taaggcacca aaagaagtaa cctttcttga aggtgattca catgacacag 360
 tacttacctc tgaggagggt gttctcaaga acggtgaact cgaagcactc gagacgcccg 420
 5 ttgatagctt cacaaatgga gctatcgttg gcacaccagt ctgtgtaa at ggcctcatgc 480
 tcttagagat taaggacaaa gaacaatact gcgcattgtc tcctggttta ctggctacaa 540
 acaatgtctt tcgcttaaaa ggggggtgcac caattaaagg tgtaacctt ggagaagata 600
 10 ctgtttggga agttcaagg tacaagaatg tgagaatcac atttgagctt gatgaacgtg 660
 ttgacaaagt gcttaatgaa aagtgctctg tctacactgt tgaatccggt accgaagtta 720
 ctgagtttgc atgtgttgta gcagaggctg ttgtgaagac tttacaacca gtttctgac 780
 15 tccttaccaa catgggtatt gatcttgatg agtggagtgt agctacattc tacttatttg 840
 atgatgctgg tgaagaaaac ttttcatcac gtatgtattg ttccttttac cctccagatg 900
 aggaagaaga ggacgatgca gagtgtgagg aagaagaaat tgatgaaacc tgtgaacatg 960
 20 agtacggtac agaggatgat tatcaaggtc tccctctgga atttggtgcc tcagctgaaa 1020
 cagttcgagt tgaggaagaa gaagaggaag actggctgga tgatactact gagcaatcag 1080
 agattgagcc agaaccagaa cctacacctg aagaaccagt taatcagttt actggttatt 1140
 25 taaaacttac tgacaatgtt gccattaaat gtgttgacat cgттаaggag gcacaaagtg 1200
 ctaatcctat ggtgattgta aatgctgcta acatacacct gaaacatggt ggtgggtgtag 1260
 caggtgcact caacaaggca accaatggtg ccatgcaaaa ggagagtgat gattacatta 1320
 30 agctaaatgg ccctcttaca gtaggagggt cttgtttgct ttctggacat aatcttgcta 1380
 agaagtgtct gcatgttggt ggacctaac taaatgcagg tgaggacatc cagcttctta 1440
 aggcagcata tgaaaatttc aattcacagg acatcttact tgcaccattg ttgtcagcag 1500
 35 gcatatttgg tgctaaacca cttcagctt tacaagtgtg cgtgcagacg gttcgtacac 1560
 aggtttatat tgcagtcaat gacaaagctc tttatgagca gtttgtcatg gattatcttg 1620
 ataacctgaa gcctagagtg gaagcaccta aacaagagga gccaccaaac acagaagatt 1680
 40 ccaaaactga ggagaaatct gtcgtacaga agcctgtcga tgtgaagcca aaaattaagg 1740
 cctgcattga tgaggttacc acaacactgg aagaaactaa gtttcttacc aataagttac 1800
 tcttgtttgc tgatatcaat ggtaagcttt accatgattc tcagaacatg cttagagggtg 1860
 45 aagatatgtc tttccttgag aaggatgcac cttacatggt aggtgatggt atcactagtg 1920
 gtgatatcac ttgtgttgta ataccctcca aaaaggctgg tggcactact gagatgctct 1980
 caagagcttt gaagaaagtg ccagttgatg agtatata 2018

50 <210> 44
 <211> 1442
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 55 <400> 44

EP 1 694 829 B1

ttgatgaggt taccacaaca ctggaagaaa ctaagtttct taccaataag ttactccttgt 60
 ttgctgatat caatggtaag ctttaccatg attctcagaa catgcttaga ggtgaagata 120
 5 tgtctttcct tgagaaggat gcaccttaca tggtaggatga tgttatcact agtgggtgata 180
 tcacttgtgt tgtaataccc tccaaaaagg ctggtggcac tactgagatg ctctcaagag 240
 ctttgaagaa agtgccagtt gatgagtata taaccacgta ccctggacaa ggatgtgctg 300
 10 gttatacact tgaggaagct aagactgctc ttaagaaatg caaatctgca ttttatgtac 360
 taccttcaga agcacctaata gctaaggaag agattctagg aactgtatcc tggaatttga 420
 gagaaatgct tgctcatgct gaagagacaa gaaaattaat gcctatatgc atggatgtta 480
 15 gagccataat ggcaaccatc caacgtaagt ataaaggaat taaaattcaa gagggcatcg 540
 ttgactatgg tgtccgattc ttcttttata ctagtaaaga gcctgtagct tctattatta 600
 cgaagctgaa ctctctaaat gagccgcttg tcacaatgcc aattggttat gtgacacatg 660
 20 gttttaatct tgaagaggct gcgcgctgta tgcgttctct taaagctcct gccgtagtgt 720
 cagtatcatc accagatgct gttactacat ataatggata cctcacttcg tcatcaaaga 780
 catctgagga gcactttgta gaaacagttt ctttggctgg ctcttacaga gattggtcct 840
 25 attcaggaca gcgtacagag ttaggtgttg aatttcttaa gcgtggtgac aaaattgtgt 900
 accacactct ggagagcccc gtcgagtttc atcttgacgg tgaggttctt tcacttgaca 960
 aactaaagag tctcttatcc ctgcgggagg ttaagactat aaaagtgttc acaactgtgg 1020
 30 acaacactaa tctccacaca cagcttgtgg atatgtctat gacatatgga cagcagtttg 1080
 gtccaacata cttggatggg gctgatgtta caaaaattaa acctcatgta aatcatgagg 1140
 gtaagacttt ctttgtacta cctagtgatg acacactacg tagtgaagct ttcgagtact 1200
 35 accatactct tgatgagagt tttcttggtg ggtacatgtc tgctttaaac cacacaaaga 1260
 aatggaaatt tcctcaagtt ggtggtttta cttcaattaa atgggctgat aacaattggt 1320
 atttgtctag tgttttatta gcacttcaac agcttgaagt caaattcaat gcaccagcac 1380
 40 ttcaagaggc ttattataga gcccgtgctg gtgatgctgc taacttttgt gcactcatac 1440
 tc 1442

45 <210> 45
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

50 <400> 45

atatgtctat gacatatgga cagcagtttg gtccaacata cttggatggg gctgatgtta 60
 caaaaattaa acctcatgta aatcatgagg gtaagacttt ctttgtacta cctagtgatg 120

55

EP 1 694 829 B1

acacactacg tagtgaagct ttcgagtact accatactct tgatgagagt tttcttggt 180
 ggtacatgtc tgctttaaac cacacaaaga aatggaaatt tcctcaagtt ggtggtttaa 240
 5 cttcaattaa atgggctgat aacaattggt atttgtctag tgttttatta gcacttcaac 300
 agcttgaagt caaattcaat gcaccagcac ttcaagaggc ttattataga gcccgtgctg 360
 gtgatgctgc taacttttgt gcactcatac tcgcttacag taataaaact gttggcgagc 420
 10 ttggtgatgt cagagaaact atgacccatc ttctacagca tgctaatttg gaatctgcaa 480
 agcgagttct taatgtggtg tgtaaacatt gtggtcagaa aactactacc ttaacgggtg 540
 tagaagctgt gatgtatatg ggtactctat cttatgataa tcttaagaca ggtgtttcca 600
 15 ttccatgtgt gtgtggctcg gatgctacac aatatctagt acaacaagag tcttcttttg 660
 ttatgatgtc tgcaccacct gctgagtata aattacagca aggtacattc ttatgtgcca 720
 atgagtacac tggtaactat cagtgtggtc attacactca tataactgct aaggagacc 780
 20 tctatcgat tgacggagct caccttaca agatgtcaga gtacaaagga ccagtgactg 840
 atgttttcta caaggaaaca tcttacta caaccatcaa gcctgtgtcg tataaactcg 900
 atggagttac ttacacagag attgaaccaa aattggatgg gtattataaa aaggataatg 960
 25 cttactatac agagcagcct atagaccttg taccaactca accattacca aatgagagtt 1020
 ttgataattt caaactcaca tgttctaaca 1050

30 <210> 46
 <211> 1995
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

35 <400> 46

tttgtgcact catactcgct tacagtaata aaactgttgg cgagcttggt gatgtcagag 60
 aaactatgac ccatcttcta cagcatgcta atttggaatc tgcaaagcga gttcttaaatg 120
 40 tgggtgtgtaa acattgtggc cagaaaacta ctaccttaac ggggtgtagaa gctgtgatgt 180
 atatgggtac tctatcttat gataatctta agacaggtgt ttccattcca tgtgtgtgtg 240
 gtcgtgatgc tacacaatat ctagtacaac aagagtcttc ttttgttatg atgtctgcac 300
 45 cacctgctga gtataaatta cagcaaggta cattcttatg tgcgaaatgag tacactggta 360
 actatcagtg tggtcattac actcatataa ctgctaagga gaccctctat cgtattgacg 420
 gagctcacct tacaagatg tcagagtaca aaggaccagt gactgatggt ttctacaagg 480
 50 aaacatctta cactacaacc atcaagcctg tgtcgtataa actcgatgga gttacttaca 540
 cagagattga accaaaattg gatgggtatt ataaaaagga taatgcttac tatacagagc 600
 agcctataga cttgtacca actcaaccat taccaaatgc gagttttgat aatttcaaac 660
 55 tcacatgttc taacacaaaa tttgctgatg atttaaataa aatgacaggc ttcacaaagc 720

EP 1 694 829 B1

	cagcttcacg agagctatct gtcacattct tcccagactt gaatggcgat gtagtggcta	780
	ttgactatag acactattca gcgagtttca agaaagggtgc taaattactg cataagccaa	840
5	ttgtttggca cattaaccag gctacaacca agacaacggt caaaccaaac acttgggtgtt	900
	tacgttgtct ttggagtaca aagccagtag atacttcaaa ttcatttgaa gttctggcag	960
	tagaagacac acaaggaatg gacaatcttg cttgtgaaag tcaacaacc acctctgaag	1020
10	aagtagtgga aaatcctacc atacagaagg aagtcataga gtgtgacgtg aaaactaccg	1080
	aagttgtagg caatgtcata cttaaaccat cagatgaagg tgtaaagta acacaagagt	1140
	taggtcatga ggatcttatg gctgcttatg tggaaaacac aagcattacc attaagaaac	1200
15	ctaagtagct ttcactagcc ttaggtttta aaacaattgc cactcatggt attgctgcaa	1260
	ttaatagtgt tccttggagt aaaatthttg cttatgtcaa accattctta ggacaagcag	1320
	caattacaac atcaaattgc gctaagagat tagcacaacg tgtgtttaac aattatatgc	1380
20	cttatgtgtt tacattattg ttccaattgt gtacttttac taaaagtacc aattctagaa	1440
	ttagagcttc actacctaca actattgcta aaaatagtgt taagagtgtt gctaaattat	1500
	gtttggatgc cggcattaat tatgtgaagt cacccaaatt ttctaaattg ttcacaatcg	1560
25	ctatgtggct attgtttgta agtatttgct taggttctct aatctgtgta actgctgctt	1620
	ttggtgtact cttatctaatt tttggtgctc cttcttattg taatggcggt agagaattgt	1680
	atcttaattc gtctaacggt actactatgg atttctgtga aggttctttt ccttgcagca	1740
30	ttgttttaag tggattagac tcccttgatt cttatccagc tcttgaacc attcaggtga	1800
	cgatttcacg gtacaagcta gacttgacaa ttttaggtct ggccgctgag tgggttttgg	1860
	catatatgtt gttcacaana ttcttttatt tattaggtct ttcagctata atgcaggtgt	1920
35	tctttggcta ttttgctagt catttcatca gcaattcttg gctcatgtgg tttatcatta	1980
	gtattgtaca aatgg	1995
40	<210> 47	
	<211> 1884	
	<212> DNA	
	<213> CORONAVIRUS	
45	<400> 47	
	aattcttggc tcatgtgggt tatcattagt attgtacaaa tggcaccggt ttctgcaatg	60
50	gttaggatgt acatcttctt tgcttctttc tactacatat ggaagagcta tgttcatatc	120
	atggatgggt gcacctcttc gacttgcacg atgtgctata agcgcaatcg tgccacacgc	180
	gttgagtgta caactattgt taatggcatg aagagatctt tctatgtcta tgcaaatgga	240
55	ggccgtggct tctgcaagac tcacaattgg aattgtctca attgtgacac attttgcact	300
	ggtagtacat tcattagtga tgaagttgct cgtgatttgt cactccaggt taaaagacca	360

EP 1 694 829 B1

atcaacccta ctgaccagtc atcgtatatt gttgatagtg ttgctgtgaa aaatggcgcg 420
 cttcacctct actttgacaa ggctgggtcaa aagacctatg agagacatcc gctctcccat 480
 5 tttgtcaatt tagacaattt gagagctaac aacctaaag gttcactgcc tattaatgtc 540
 atagtttttg atggcaagtc caaatgcgac gagtctgctt ctaagtctgc ttctgtgtac 600
 tacagtcagc tgatgtgcca acctattctg ttgcttgacc aagctcttgt atcagacgtt 660
 10 ggagatagta ctgaagtttc cgtaagatg tttgatgctt atgtcgacac cttttcagca 720
 acttttagtg ttcttatgga aaaacttaag gcacttggtg ctacagctca cagcgagtta 780
 gcaaaggggtg tagctttaga tgggtgcctt tctacattcg tgtcagctgc cgcacaaggt 840
 15 gttgttgata ccgatgttga cacaaaggat gttattgaat gtctcaaact ttcacatcac 900
 tctgacttag aagtgcagag tgacagttgt aacaatttca tgctcaccta taataagggt 960
 gaaaacatga cgcccagaga tcttggcgca tgtattgact gtaatgcaag gcatatcaat 1020
 20 gcccaagtag caaaaagtca caatgtttca ctcatctgga atgtaaaaga ctacatgtct 1080
 ttatctgaac agctgcgtaa acaaattcgt agtgctgcca agaagaaca catacctttt 1140
 agactaactt gtgctacaac tagacagggt gtcaatgtca taactactaa aatctcactc 1200
 25 aagggtggta agattgtag tacttgttt aaacttatgc ttaaggccac attattgtgc 1260
 gttcttgctg cattggtttg ttatatcgtt atgccagtac atacattgtc aatccatgat 1320
 ggttacacaa atgaaatcat tggttacaaa gccattcagg atgggtgcac tcgtgacatc 1380
 30 atttctactg atgattgttt tgcaataaaa catgctgggt ttgacgcatg gtttagccag 1440
 cgtgggtggt catacaaaaa tgacaaaagc tgccctgtag tagctgctat cattacaaga 1500
 gagattggtt tcatagtgcc tggcttaccg ggtactgtgc tgagagcaat caatggtgac 1560
 35 ttcttgcat ttctacctcg tgtttttagt gctgttggca acatttgcta cacaccttc 1620
 aaactcattg agtatagtga ttttgctacc tctgcttgcg ttcttgctgc tgagtgtaca 1680
 atttttaagg atgctatggg caaacctgtg ccatattgtt atgacactaa tttgctagag 1740
 40 ggttctatctt cttatagtga gcttcgtcca gacactcgtt atgtgcttat ggatggttcc 1800
 atcatacagt ttctaacac ttacctggag ggttctgtta gagtagtaac aacttttgat 1860
 gctgagtact gtagacatgg taca 1884
 45
 <210> 48
 <211> 2020
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS
 50
 <400> 48
 cactcgttat gtgcttatgg atggttccat catacagttt cctaacactt acctggaggg 60
 55 ttctgttaga gtagtaacaa cttttgatgc tgagtactgt agacatggta catgcgaaag 120

EP 1 694 829 B1

gtcagaagta ggtatttgcc tatctaccag tggtagatgg gttcttaata atgagcatta 180
 cagagctcta tcaggagttt tctgtgggtg tgatgcatg aatctcatag ctaacatctt 240
 5 tactcctctt gtgcaacctg tgggtgcttt agatgtgtct gcttcagtag tggctgggtg 300
 tattattgcc atattggtga cttgtgctgc ctactacttt atgaaattca gacgtgtttt 360
 tgggtgagtac aaccatgttg ttgctgctaa tgcacttttg tttttgatgt ctttcactat 420
 10 actctgtctg gtaccagctt acagctttct gccgggagtc tactcagtct tttacttgta 480
 cttgacattc tatttcacca atgatgtttc attcttggct caccttcaat ggtttgccat 540
 gttttctcct attgtgcctt tttggataac agcaatctat gtattctgta tttctctgaa 600
 15 gcactgccat tggttcttta acaactatct taggaaaaga gtcatgttta atggagttac 660
 atttagtacc ttcgaggagg ctgctttgtg tacctttttg ctcaacaagg aaatgtacct 720
 aaaattgctg agcgagacac tgttgccact tacacagtat aacaggatc ttgctctata 780
 20 taacaagtac aagtatttca gtggagcctt agatactacc agctatcgtg aagcagcttg 840
 ctgccactta gcaaaggctc taaatgactt tagcaactca ggtgctgatg ttctctacca 900
 accaccacag acatcaatca cttctgctgt tctgcagagt ggttttagga aaatggcatt 960
 25 cccgtcaggc aaagttgaag ggtgcatggt acaagtaacc tgtggaacta caactcttaa 1020
 tggattgtgg ttggatgaca cagtatactg tccaagacat gtcatttgca cagcagaaga 1080
 catgcttaat cctaactatg aagatctgct cattcgcaaa tccaaccata gctttcttgt 1140
 30 tcaggctggc aatgttcaac ttcgtgttat tggccattct atgcaaaatt gtctgcttag 1200
 gcttaaagtt gatacttcta accctaagac acccaagtat aaatttgtcc gtatccaacc 1260
 tggtcacaaca ttttcagttc tagcatgcta caatggttca ccatctggtg tttatcagtg 1320
 35 tgccatgaga cctaatacata ccattaaagg ttctttcctt aatggatcat gtggtagtg 1380
 tggttttaac attgattatg attgctgtgc tttctgctat atgcatcata tggagcttcc 1440
 aacaggagta cacgctggta ctgacttaga aggtaaattc tatggtccat ttgttgacag 1500
 40 acaaactgca caggctgcag gtacagacac aaccataaca ttaaattgtt tggcatggct 1560
 gtatgctgct gttatcaatg gtgatagggt gtttcttaat agattcacca ctactttgaa 1620
 tgactttaac cttgtggcaa tgaagtacaa ctatgaacct ttgacacaag atcatgttga 1680
 45 catattggga cctctttctg ctcaaacagg aattgccgct ttagatatgt gtgctgcttt 1740
 gaaagagctg ctgcagaatg gtatgaatgg tcgtactatc cttggtagca ctattttaga 1800
 agatgagttt acaccatttg atgttgtag acaatgctct ggtgttacct tccaaggtaa 1860
 50 gttcaagaaa attgttaagg gcactcatca ttggatgctt ttaactttct tgacatcact 1920
 attgattctt gttcaagta cacagtgtgc actgttttct tttgtttacg agaatgcttt 1980
 cttgccattt actcttggtt ttatggcaat tgctgcatgt 2020

55
 <210> 49
 <211> 2040
 <212> DNA

EP 1 694 829 B1

<213> CORONAVIRUS

<400> 49

5 agcatttcca gcctgaagac gtactgtagc agctaaactg cccagcacca tacctctatt 60
 taggttgttt aagcctttga tgaagtacaa gtatttcact ttaggccctt ttggtgtgtc 120
 tgtaacaaac ctacaaggtg gttccagttc tgtgtaaatt gtacctgtac catcactctt 180
 10 agggaatcta gcccatTTga gatcttggtg gtctgatagt aatgccagca caaacctacc 240
 tcccttcgaa ttgttatagt aggcaagtgc attgtcatca gtacaagctg tttgtgtggt 300
 accagccgca caggacatct gtcgtagtgc tactggactc agttcattat tctgtagttt 360
 15 aacagctgag ttggctctta gagctgtaac aataagaggc caagccaaat ttggtgaatt 420
 gtccatgtta atttcactaa gttgaacaat cttgctatcc gcatcaacaa cttgctggat 480
 ttcccagagt gcagatgcat atgtaaaggt gttaccatca caagtgttct tgtaggtacc 540
 20 ataatcaggg acaacaacca tgagtttggc tgctgtagtc aatggtatga tgttgagtgg 600
 aacacaacca tcacgcgcat tgttgataat gttgttaagt gcatcattat caagcttcct 660
 aagcatagtg aagagcattg tttgcatagc actagttact tttgccctct tgtcctcaga 720
 25 tcttgcctgt ttgtacattt gggatcatagc ctgatctgcc atcttttcca acttgcgttg 780
 catggcagca tcacggtcaa actcagattt agccacattc aaagatttct ttaacttttt 840
 gagaacgact tcagaatcac cattagctac agcctgctca taggcctcct gggcagtgcc 900
 30 ataagcggca tatgatggta aagaactaaa ttctgaagca atagcctgaa gagtagcacg 960
 gttatcgagc atttcctcgc acaacctatt aatgtctaca gcaccctgca tggatagcaa 1020
 aacagacaaa agagaaacca tcttctcgaa agcttcagtt gtgtcttttg caagaagaat 1080
 35 atcattgtgg agttgtacac attgtgcca caatttagaa gatgactcta ctctaagttg 1140
 ttgaagaacc gagagcagta ccacagatgt gcactttacg tcagacattt tagactgtac 1200
 agtagcaacc ttgatacatg gtttacctcc aataccaac aacttaatgt taagcttgaa 1260
 40 agcatcaata ctactcttag gaggcaaaag cccctgggag ttcataatcc taaattcttg 1320
 tgtagagacc aagtagtcat aaacaccaag agtaagcctg aagtaacggt tgagtaaaca 1380
 gaaaaggcca aagtagcagc agcaacaata gcctaagaaa caataaaca gcatgataca 1440
 45 ctgtaagggtg ttgccagtaa taaataaca tgggtaatac tcaacacaca caaacactat 1500
 agctctagct aaaaacatga tagtcgtaac gacaccagaa tagttagagg ttacagaaat 1560
 aactaaggcc cacatggaaa tagcttgatc taaagcatta ccatagtaga ctttgtaaac 1620
 50 aagtgtaatg acattcatca gtgtccaaac acgtctagca gcatcatcat aaacagtgcg 1680
 agctgtcatg agaataagca aactaaagc tgaagcatac ataacacaat ccttaagcct 1740
 55 ataaccagac aagctagtgt cagccaattc aagccatgtc atgatacgca tcaccagct 1800

EP 1 694 829 B1

agcaggcatg tagaccatat taaagtaagc aactgttgca agagaaggta acagaaacaa 1860
 gcacaagaat gcgtgcttat gcttaacaag cagcatagca catgcagcaa ttgccataat 1920
 5 accaagagta aatggcaaga aagcattctc gtaaacaaga aaaaacagtg accactgtgt 1980
 actttgaaca agaatcaata gtgatgtcaa gaaagttaaa agcatccaat gatgagtgca 2040

 10 <210> 50
 <211> 2012
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

 15 <400> 50

 cttgtagggt tgttacagac acaccaaaaag ggcctaaagt gaaatacttg tacttcatca 60
 aaggcttaaa caacctaaat agaggatggt tgctgggagc tttagctgct acagtacgct 120
 20 ttcaggctgg aaatgctaca gaagtacctg ccaattcaac tgtgctttcc ttctgtgctt 180
 ttgcagtaga ccctgctaaa gcatataagg attacctagc aagtggagga caaccaatca 240
 ccaactgtgt gaagatggtg tgtacacaca ctggtacagg acaggcaatt actgtaacac 300
 25 cagaagctaa catggacca gagtcctttg gtgggtgctc atgttgctctg tattgtagat 360
 gccacattga ccatccaaat cctaaaggat tctgtgactt gaaaggtaag tacgtccaaa 420
 tacctaccac ttgtgctaata gaccagtggt gttttact tagaaacaca gtctgtaccg 480
 30 tctgcggaat gtggaaagggt tatggctgta gttgtgacca actccgcaa cccttgatgc 540
 agtctgcgga tgcataacg tttttaaacg ggtttgcggt gtaagtgcag cccgtcttac 600
 accgtgcggc acaggcacta gtactgatgt cgtctacagg gcttttgata tttaaacga 660
 35 aaaagttgct ggttttgcaa agttcctaaa aactaattgc tgtcgcttc aggagaagga 720
 tgaggaaggc aatttattag actcttactt tgtagttaag aggcatacta tgtctaacta 780
 ccaacatgaa gagactattt ataacttgggt taaagattgt ccagcgggtg ctgtccatga 840
 40 ctttttcaag tttagagtag atggtgacat ggtaccacat atatcacgct agcgtctaac 900
 taaatacaca atggctgatt tagtctatgc tctacgtcat tttgatgagg gtaattgtga 960
 tacattaaaa gaaatactcg tcacatacaa ttgctgtgat gatgattatt tcaataagaa 1020
 45 ggattggtat gacttcgtag agaatcctga catcttacgc gtatatgcta acttaggtga 1080
 gcgtgtacgc caatcattat taaagactgt acaattctgc gatgctatgc gtgatgcagg 1140
 cattgtaggc gtactgacat tagataatca ggatcttaat gggactggt acgatttcgg 1200
 50 tgatttcgta caagtagcac caggctgcgg agttcctatt gtggattcat attactcatt 1260
 gctgatgcc atcctcactt tgactagggc attggctgct gactccata tggatgctga 1320
 tctcgcaaaa ccacttatta agtgggattt gctgaaatat gattttacgg aagagagact 1380
 55 ttgtctcttc gaccgttatt ttaaattatt ggaccagaca taccatccca attgtattaa 1440

EP 1 694 829 B1

ctgtttggat gataggtgta tccttcattg tgcaaacctt aatgtgttat tttctactgt 1500
 gtttccacct acaagttttg gaccactagt aagaaaaata tttgtagatg gtgttccttt 1560
 5 tgttgtttca actggatacc attttcgtga gttaggagtc gtacataatc aggatgtaaa 1620
 cttacatagc tcgcgtctca gtttcaagga acttttagtg tatgctgctg atccagctat 1680
 gcatgcagct tctggcaatt tattgctaga taaacgcact acatgctttt cagtagctgc 1740
 10 actaacaac aatgttgctt ttcaaacctg caaacccggt aattttaata aagactttta 1800
 tgactttgct gtgtctaaag gtttctttaa ggaaggaagt tctgttgaac taaaacactt 1860
 cttctttgct caggatggca acgctgctat cagtgattat gactattatc gttataatct 1920
 15 gccaacaatg tgtgatatca gacaactcct attcgtagtt gaagttggtg ataaataactt 1980
 tgattgttac gatggtggct gtattaatgc ca 2012

20 <210> 51
 <211> 1877
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

25 <400> 51

gtacttcgcg tacagtggca ataccatag acagcttaaa tgtttcctca gtggctttga 60
 30 gcgtttctgc tgcgaaaagc ttgagtctct cagtacaagt gttggcaagt atgtaatcgc 120
 cagcattagt ccaatcacat gttgctatcg cattgaagtc agtgacattg tcaactgccta 180
 cacatgtggt tttgtataaa caaaaacct gaccattagc acataatgga aaactaatgg 240
 35 gaggcttatg tgacttgcaa taatagctca tacctcctag atacagttgt gtcacatcag 300
 tgacatcaca acctggggca ttgcaaacat agggattaac agacaacact aatttgtgtg 360
 atgttgaaat gacatggca tagcagcact tgcaacatag gaatggctc ctaatacagg 420
 40 caccgcaacg aagtgaagtc tgtgaattgc acaatacaca agcacctaca gcctgcaaga 480
 ctgtatgtgg tgtgtacata gcctcataaa actcagggtc ccagtaccgt gaggtgttat 540
 cattagttag cattacggaa tacatgtcca acatgtggcc agtaagctca tcatgtaact 600
 45 ttctaatagta ttgtaaatac aagtgaaga catcagcata ctctgatta ggatgttttg 660
 taagtgggta agcatcaata gccagtgaca cgaacctttc aatcataagt gtaccatctg 720
 ttttgacaat atcatcgaca aaacagcctg cgcctaatat tcttgatgga tctgggtaag 780
 50 gcaggtacac gtaatcatct cttgtttta ctagcattgt atgctgtgag caaaattcgt 840
 gaggtccttt agtaaggca gtctcagtc aacattttgc ctcagacatg aacacattat 900
 tttgataata aagaactgcc ttaaagttct taatgctagc tactaaacct tgagccgcat 960
 55 agttactggt atagcacaca acggcatcat cagaaagaat catcatggag aaatgtttac 1020
 gcaggtgagc gtaaaactca tccacgaatt catgatcaac atccctattt ctatagagac 1080

EP 1 694 829 B1

5 actcatagag cctgtgttgt agattgcgga cataactgtc agctatctta ttaccatcag 1140
 ttgaaagaag tgcatttaca ttggctgtaa cagcttgaca aatgttaaag aactattag 1200
 10 cataagcagt tgtagcatca ccggatgatg ttccacctgg tttaacatat agtgagccgc 1260
 cacacatgac catctcactt aatacttgcg cacactcgtt agctaacctg tagaaacggg 1320
 gtgataagtt acagcaagtg ttatgtttgc gagcaagaac aagagaggcc attatcctaa 1380
 15 gcatgttagg catggctctg tcacattttg gataatccca acccataagg tgtggagttt 1440
 ctacatcact gtaaacagtt tttaacatat tatgccagcc accgtaaac ttgcttgttc 1500
 caattaccac agtagctcct ctagtggcgg ctattgactt caataatttc tgatgaaact 1560
 20 gtctatttgt catagtacta cagatagaga caccagctac ggtgagct ctattctttg 1620
 cactaatggc aacttaaga ttcatttgag ttatagtagg gatgacatta cgcttagtat 1680
 acgcgaaaag tgcatttga tcctcataac tcattgagtc ataataaagt ctagccttac 1740
 25 cccatttatt aatgggaaa ccagctgatt tatccagatt gttaacgatt acttggttg 1800
 cattaataca gccaccatcg taacaatcaa agtatttatt aacaacttca actacgaata 1860
 ggagttgtct gatatca 1877

30 <210> 52
 <211> 2051
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

<400> 52
 35 tcagggtccaa tcttgacaaa gtacttcatt gatgtaagct caaagccatg cgcccaaagg 60
 acgaacacga ctctgtctga caatcctttc agtgtatcac tgagcatttg tactatctta 120
 atacgcacta cattccaggg caagccttta tacatgagtg gtataagatg tttaaactgg 180
 40 tcacctggtg gaggttttgc attaactctg gtgaattctg tgttattttc agtgtcaaca 240
 taaccagtcg gtacagctac taagttaaca cctgtagaaa atcctagctg gagaggtagg 300
 ttagtaccga cagcatctct agttgcatga cagccctcta catcaaagcc aatccacgca 360
 45 cgaacgtgac gaatagcttc ttcgcggtg ataaacatat tagggtaacc attgacttgg 420
 taattcattt tgaaacccat catagagatg agtctacggt aggtcatgtc ctttggtatg 480
 cctggatgt caacacataa tccttcagtc ttgaacttta tatcaacgct gaggtgtgta 540
 50 ggtgcctgtg taggatgaag accagtaatg atcttactac agtccttaaa aagtccagtt 600
 acattttctg cttgtaatgt agccacattg cgacgtggta tttctagact tgtaaattgc 660
 agtttgtcat aaagatctct atcagacatt atgcacaaa tgccaatttt tgcccttgtg 720
 55 atagccacat tgaagcgggt gacattacaa gagtgtgctg tttcagtagt ttgtgtgaat 780
 atgacatagt catattcaga accctgtgat gaatcaacag tctgcgtagg caatcctaag 840

EP 1 694 829 B1

atttttgaag ctacagcgtt ctgtgaatta taaggtgaga taaaaacagc ttttctccaa 900
 gcaggattgc gtgtaagaaa ttctcttaca acgcctatth gaggtctgth gattgcagat 960
 5 gaaacatcat gtgtaataac acctttgtag aacatthtga agcattgagc tgacttatcc 1020
 ttgtgtgctt ttagcttatt gtcataaact aaagcactca cagtgtcaac aatthcagca 1080
 ggacaacggc gacaagttcc aaggaacatg tctggaccta ttgtthtcat aagtctgcac 1140
 10 actgaattaa aatattctgg ttctagtgtg cthttagthca gcaatgtgch gggggctggt 1200
 aattgagchag gatcgccaat atagacgtag tgtthtgcac gaagtctagc attgacaaca 1260
 ctcaagthcat aattagthagc catagagatt tcatcaaaga ctacaatgth agcagthtgtt 1320
 15 tctggcaatg catttacagth gcagaaaaca tactgttcta gtgttgaatt cactthtgaat 1380
 ttatcaaaac actctacgch cgcacgchca ggtatgattc tactacatth atctatgggc 1440
 aaataththta atgcctthtc acatagggca tcaacagctg catgagagca tgccgtatac 1500
 20 actatgchag chagatgggta atagagagca agtccgathg caaatgact cttaccagta 1560
 ccaggthgthc cthggagthg agagthctth tgcathgccga cththtgata atthgcaaca 1620
 ttgctagaaa actcatctga gatgtthgagth gthgggtaca agccagthaat tctcacathag 1680
 25 tgctctthgth gcactagagth aggtgcacta agthggcath cagthgtgaga tgtcaacaca 1740
 aagthaatcac caacaththca cthgtathgth gthagthactc thtacacaaac agcathcacca 1800
 thagthcacctth ththcaaaggt gthactctca atctgthactth tactaththth agthtacacgg 1860
 30 thaacchagthaa agacathagth tctgtthcaat gthgthgthctag gthththcaac ctcccatgaa 1920
 agathgcaath ctctgthcaga gathactthcg chgthacagthg caathaccata thgacagctta 1980
 aathgththcct chagthggctth gagchgtthct gctgchgaaaa gctthgagthct ctchagthacaa 2040
 35 gthgtthggcaa g 2051

40 <210> 53
 <211> 2075
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

45 <400> 53

tgctthgthagth thtgggthaga aggtththcaac atgtccathcc thacacchaaa gcatgathgth 60
 aatthcagca thagthcaathg thaacctthgac cactththgaa atcactgaca aathctthgthgth 120
 50 cththattathc thgacaaagth catcaagthaa aagathcaathc acagaaacaca cacathththgth 180
 thgaaacctgth thgchcatctg thththgaaagth atthththcact gthgctgthcca thagggathaaa 240
 atcctctaat thaaagthggth aathctthgthgth gchgctthggct aagchctathca thaaathgaa 300
 55 accgchcaagth thgtccathgac thgaaathctcc athaaachgathg thgtthcgaagg cathagchctc 360
 gagctthathat chgctgthathg aththathccath agchgagctchg agaaagthchag ththchaththg 420

EP 1 694 829 B1

	tgatctgggc	ttaaaatcct	ctaagtctct	gctctgagta	aagtaggttt	caggcaactg	480
	ttgaataatg	ccgtctactt	tcttaaagta	gttaaactgt	gtttttactg	attctccaat	540
5	taatgtgact	ccattgacgc	tagcttgtgc	tggtcccttt	gaagggtgta	gacctttgac	600
	tgaaccttct	gttattaaaa	caccattacg	ggcgtttcta	aaaagggtcta	cctgtccttc	660
	cactctacca	tcaaacaaga	cagtaagtga	agaacaagca	ctctcagtag	gtttcttggc	720
10	aatgtcagtc	attgtgcaga	cacctattgt	agatacatgt	gctggggctt	ctcttttgta	780
	gtcccagatt	acagtattag	cagcgatatac	aacacccaaa	ttattgagta	tcttaatctc	840
	tggcactggg	ttaatgttac	gcttagccca	aagctcaaata	gcaacattaa	caggaagtgt	900
15	tgtcttattt	tcaaagatct	ccacatcaat	accatctacc	tttgtgtaaa	cagcattatt	960
	aatgatggaa	acagggtgctt	cgccggcgtg	tccatcaaag	tgctcctttat	taacaacatt	1020
	ataagccaca	ttttctaaac	tctgtaacct	ggtaaagtga	ttccacaggt	tataagtatac	1080
20	aaattgtttg	taaatccata	ggctaaatcc	agcagaaatc	atcatattat	atgcatccaa	1140
	gtactgtcgg	tactcatttg	catgggtgtct	gcaaacagca	ccacctaaat	tgcatacgtg	1200
	aatacacgta	gcagatttga	gtggaacata	atcaatatcc	gacactactt	gtttgccatg	1260
25	agactcaca	ggactatcag	aatagtaaaa	gaaaggcaat	tgctttaaat	tagtaaatgc	1320
	acttttatcg	aaagctggag	tgtggaatgc	atgcttattc	acatacaaac	taccaccatc	1380
	acagcctggg	aagttcaagt	ttgacaagac	tcttgtgtca	aacctacaca	caattgcatt	1440
30	ggctgggtaa	cgatcaacgt	tacaattcca	aaacaacaa	acaccatcag	tgaatttatc	1500
	gtgatgtgta	gcataagaat	agaagagttc	ctctattttg	taagctttgt	cactacatgg	1560
	ctgagcatcg	tagaacttcc	attctacttc	agcctgaggc	acacacttga	tagcctttgg	1620
35	atttccaatg	tcatgaagaa	ctggaaactt	atcagcaagc	aatgcagact	tcacaacat	1680
	gtgttgact	tttctgcaag	cagaattaac	cctcagttca	tctcctataa	tagggatttc	1740
	aacagaccaa	tcaacgcgct	taacaaagca	ctcatggact	gctaaacatc	tagtcatgat	1800
40	agcatcaca	ctagccacat	gtgcatttcc	atgtacctgg	caatgttggg	catggttact	1860
	ctgaagggta	cccgtaaagc	cccactgctg	aacatcaatc	ataaatgggt	tatagacata	1920
	gtcaaaaacc	acagaatgat	tccagcaggc	ataagtatct	gatgaagtag	aaaagcaagt	1980
45	tgcacgtttg	tcacacagac	aacacgttct	ttcagggtcca	atcttgacaa	agtacttcat	2040
	tgatgtaagc	tcaaagccat	gcgcccgaag	gacga			2075

50 <210> 54
 <211> 1891
 <212> DNA
 <213> CORONAVIRUS

55 <400> 54

EP 1 694 829 B1

aagattcacc acttaaatta gaggatttta tccctatgga cagcacagtg aaaaattact 60
 tcataacaga tgcgcaaaca ggttcatcaa aatgtgtgtg ttctgtgatt gatcttttac 120
 5 ttgatgactt tgtcgagata ataaagtcac aagatttgtc agtgatttca aaagtggca 180
 aggttacaat tgactatgct gaaatttcat tcatgcttg gtgtaaggat ggacatggtg 240
 aaaccttcta cccaaaacta caagcaagtc aagcgtggca accaggtggt gcgatgccta 300
 10 acttgtacaa gatgcaaaga atgcttcttg aaaagtgtga ccttcagaat tatggtgaaa 360
 atgctgttat accaaaagga ataatgatga atgtcgcaa gtatactcaa ctgtgtcaat 420
 acttaaatac acttacttta gctgtaccct acaacatgag agttattcac tttggtgctg 480
 15 gctctgataa aggagtgtca ccaggtagag ctgtgctcag acaatgggtg ccaactggca 540
 cactacttgt cgattcagat cttaatgact tcgtctccga cgcagattct actttaattg 600
 gagactgtgc aacagtacat acggctaata aatgggacct tattattagc gatatgtatg 660
 20 accctaggac caaacatgtg acaaaagaga atgactctaa agaagggtt ttcacttatc 720
 tgtgtggatt tataaagcaa aaactagccc tgggtggttc tatagctgta aagataacag 780
 agcattcttg gaatgtgac ctttacaagc ttatgggcca tttctcatgg tggacagctt 840
 25 ttgttaca aa tgtaaatgca tcatcatcgg aagcattttt aattggggct aactatcttg 900
 gcaagccgaa ggaacaaatt gatggctata ccatgcatgc taactacatt ttctggagga 960
 acacaaatcc tatccagttg tcttccatt cactcttga catgagcaa tttcctctta 1020
 30 aattaagagg aactgctgta atgtctctta aggagaatca aatcaatgat atgatttatt 1080
 ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta gagaaaaca cagagttgtg gtttcaagtg 1140
 atattcttgt taacaactaa acgaacatgt ttattttctt attatttctt actctcacta 1200
 35 gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc 1260
 aacatacttc atctatgagg ggggttact atcctgatga aatttttaga tcagacactc 1320
 tttatttaac tcaggattta tttcttccat tttattctaa tgttacaggg tttcatacta 1380
 40 ttaatcatac gtttggcaac cctgtcatac cttttaagga tggatattat tttgctgcca 1440
 cagagaaatc aaatgttgtc cgtggttggg ttttgggtc taccatgaac aacaagtcac 1500
 agtcggtgat tattattaac aatttacta atgttgttat acgagcatgt aactttgaat 1560
 45 tgtgtgacaa cccttcttt gctgtttcta aacctatggg tacacagaca catactatga 1620
 tattcgataa tgcatttaat tgcactttcg agtacatc tgatgccttt tcgcttgatg 1680
 tttcagaaaa gtcaggtaat tttaaacact tacgagagtt tgtgtttaa aataaagatg 1740
 50 ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac ctatagatgt agttcgtgat ctaccttctg 1800
 gttttaacac tttgaaacct atttttaagt tgcctcttgg tattaacatt acaattttta 1860
 gagccattct tacagccttt tcacctgctc a 1891

55
 <210> 55
 <211> 32
 <212> DNA

EP 1 694 829 B1

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<220>

<223> amorce N sens

5

<400> 55

cccatatgtc tgataatgga cccaatcaa ac 32

<210> 56

10

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

15

<223> amorce N antisens

<400> 56

cccccggtg cctgagttga atcagcagaa gc 32

20

<210> 57

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

25

<220>

<223> amorce Sc sens

<400> 57

30

cccatatgag tgacctgac cggcgcacca c 31

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

35

<220>

<223> amorce SL sens

<400> 58

40

cccatatgaa acctgcacc ccacctgctc 30

<210> 59

<211> 33

<212> DNA

45

<213> amorce Sc et SL antisens

<400> 59

cccccggtt taatatattg ctcattttt ccc 33

50

<210> 60

<211> 16

<212> DNA

<213> amorce sens série 1

55

<400> 60

ggcatcgtat ggggtg 16

<210> 61

EP 1 694 829 B1

<211> 16
<212> DNA
<213> amorce antisens série 2 (28774-28759)

5 <400> 61
cagtttcacc acctcc 16

<210> 62
<211> 16
10 <212> DNA
<213> amorce sens série 2 (28375-28390)

<400> 62
15 ggctactacc gaagag 16

<210> 63
<211> 16
<212> DNA
20 <213> amorce antisens série 2 (28702-28687)

<400> 63
aattaccgcg actacg 16

<210> 64
25 <211> 26
<212> DNA
<213> sonde 1/série 1 (28561-28586)

<400> 64
30 ggcaccgca atcctaataa caatgc 26

<210> 65
<211> 21
<212> DNA
35 <213> sonde 2/série 1 (28588-28608)

<400> 65
gccaccgtgc tacaacttc t 21

40 <210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> sonde 1/série 2 /sonde N/FL (28541-28563)

45 <400> 66
atacaccaa agaccacatt ggc 23

<210> 67
<211> 25
50 <212> DNA
<213> sonde 2/série 2/sonde SARS/N/LC705 (28565-28589)

<400> 67
55 cccgcaatcc taataacaat gctgc 25

<210> 68
<211> 30
<212> DNA

EP 1 694 829 B1

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce ancre 14T

5

<400> 68

agatgaattc ggtaccttt tttttttt 30

<210> 69

10

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

15

<223> peptide M2-14

<400> 69

20

Ala Asp Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10

<210> 70

25

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

30

<223> peptide E1-12

<400> 70

35

Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu
1 5 10

<210> 71

40

<211> 24

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

45

<223> peptide E53-72

<400> 71

50

Lys Pro Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn Ser Ser
1 5 10 15

55

Glu Gly Val Pro Asp Leu Leu Val
20

<210> 72

<211> 153

EP 1 694 829 B1

<212> DNA
<213> CORONAVIRUS

<400> 72

5
gatattaggt ttttacctac ccaggaaaag ccaaccaacc tcgatctctt gtagatctgt 60
tctctaaacg aactttaaaa tctgtgtagc tgctgctcgg ctgcatgcct agtgcaccta 120
10 cgcagtataa acaataataa attttactgt cgt 153

<210> 73
<211> 410
<212> DNA
<213> CORONAVIRUS

<400> 73

20 ttctccagac aacttcaaaa ttccatgagt ggagcttctg ctgattcaac tcaggcataa 60
acactcatga tgaccacaca aggcagatgg gctatgtaaa cgttttcgca attccgttta 120
cgatacatag tctactcttg tgcagaatga attctcgtaa ctaaacagca caagtagggt 180
25 tagttaactt taatctcaca tagcaatctt taatcaatgt gtaacattag ggaggacttg 240
aaagagccac cacattttca tcgaggccac gcggagtacg atcgagggta cagtgaataa 300
tgctagggag agctgcctat atggaagagc cctaattgtgt aaaattaatt ttagtagtgc 360
30 tatcccatg tgattttaat agcttcttag gagaatgaca aaaaaaaaaa 410

<210> 74
<211> 4382
<212> PRT
<213> CORONAVIRUS

<400> 74

40 Met Glu Ser Leu Val Leu Gly Val Asn Glu Lys Thr His Val Gln Leu
1 5 10 15
45 Ser Leu Pro Val Leu Gln Val Arg Asp Val Leu Val Arg Gly Phe Gly
20 25 30

50

55

EP 1 694 829 B1

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

EP 1 694 829 B1

Pro Val Ala Ser Pro Gln Glu Cys Asn Asn Met His Leu Ser Thr Leu
 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385

5 Met Lys Cys Asn His Cys Asp Glu Val Ser Trp Gln Thr Cys Asp Phe
 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400

10 Leu Lys Ala Thr Cys Glu His Cys Gly Thr Glu Asn Leu Val Ile Glu
 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415

15 Gly Pro Thr Thr Cys Gly Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Val Val Lys Met
 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430

20 Pro Cys Pro Ala Cys Gln Asp Pro Glu Ile Gly Pro Glu His Ser Val
 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445

Ala Asp Tyr His Asn His Ser Asn Ile Glu Thr Arg Leu Arg Lys Gly
 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460

25 Gly Arg Thr Arg Cys Phe Gly Gly Cys Val Phe Ala Tyr Val Gly Cys
 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480

Tyr Asn Lys Arg Ala Tyr Trp Val Pro Arg Ala Ser Ala Asp Ile Gly
 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495

30 Ser Gly His Thr Gly Ile Thr Gly Asp Asn Val Glu Thr Leu Asn Glu
 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510

Asp Leu Leu Glu Ile Leu Ser Arg Glu Arg Val Asn Ile Asn Ile Val
 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525

35 Gly Asp Phe His Leu Asn Glu Glu Val Ala Ile Ile Leu Ala Ser Phe
 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540

Ser Ala Ser Thr Ser Ala Phe Ile Asp Thr Ile Lys Ser Leu Asp Tyr
 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560

40 Lys Ser Phe Lys Thr Ile Val Glu Ser Cys Gly Asn Tyr Lys Val Thr
 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575

45 Lys Gly Lys Pro Val Lys Gly Ala Trp Asn Ile Gly Gln Gln Arg Ser
 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590

Val Leu Thr Pro Leu Cys Gly Phe Pro Ser Gln Ala Ala Gly Val Ile
 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605

50 Arg Ser Ile Phe Ala Arg Thr Leu Asp Ala Ala Asn His Ser Ile Pro
 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620

55 Asp Leu Gln Arg Ala Ala Val Thr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Glu Gln
 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640

EP 1 694 829 B1

Ser Leu Arg Leu Val Asp Ala Met Val Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Thr
 580 585 590

5 Asn Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Val Thr Gly Gly Leu Val Gln Gln
 595 600 605

10 Thr Ser Gln Trp Leu Ser Asn Leu Leu Gly Thr Thr Val Glu Lys Leu
 610 615 620

Arg Pro Ile Phe Glu Trp Ile Glu Ala Lys Leu Ser Ala Gly Val Glu
 625 630 635 640

15 Phe Leu Lys Asp Ala Trp Glu Ile Leu Lys Phe Leu Ile Thr Gly Val
 645 650 655

20 Phe Asp Ile Val Lys Gly Gln Ile Gln Val Ala Ser Asp Asn Ile Lys
 660 665 670

Asp Cys Val Lys Cys Phe Ile Asp Val Val Asn Lys Ala Leu Glu Met
 675 680 685

25 Cys Ile Asp Gln Val Thr Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Ser Leu Asn
 690 695 700

30 Leu Gly Glu Val Phe Ile Ala Gln Ser Lys Gly Leu Tyr Arg Gln Cys
 705 710 715 720

Ile Arg Gly Lys Glu Gln Leu Gln Leu Leu Met Pro Leu Lys Ala Pro
 725 730 735

35 Lys Glu Val Thr Phe Leu Glu Gly Asp Ser His Asp Thr Val Leu Thr
 740 745 750

40 Ser Glu Glu Val Val Leu Lys Asn Gly Glu Leu Glu Ala Leu Glu Thr
 755 760 765

Pro Val Asp Ser Phe Thr Asn Gly Ala Ile Val Gly Thr Pro Val Cys
 770 775 780

45 Val Asn Gly Leu Met Leu Leu Glu Ile Lys Asp Lys Glu Gln Tyr Cys
 785 790 795 800

50 Ala Leu Ser Pro Gly Leu Leu Ala Thr Asn Asn Val Phe Arg Leu Lys
 805 810 815

Gly Gly Ala Pro Ile Lys Gly Val Thr Phe Gly Glu Asp Thr Val Trp
 820 825 830

55 Glu Val Gln Gly Tyr Lys Asn Val Arg Ile Thr Phe Glu Leu Asp Glu
 835 840 845

EP 1 694 829 B1

Arg Val Asp Lys Val Leu Asn Glu Lys Cys Ser Val Tyr Thr Val Glu
 850 855 860
 5 Ser Gly Thr Glu Val Thr Glu Phe Ala Cys Val Val Ala Glu Ala Val
 865 870 875 880
 Val Lys Thr Leu Gln Pro Val Ser Asp Leu Leu Thr Asn Met Gly Ile
 885 890 895
 10 Asp Leu Asp Glu Trp Ser Val Ala Thr Phe Tyr Leu Phe Asp Asp Ala
 900 905 910
 15 Gly Glu Glu Asn Phe Ser Ser Arg Met Tyr Cys Ser Phe Tyr Pro Pro
 915 920 925
 20 Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Ala Glu Cys Glu Glu Glu Ile Asp
 930 935 940
 Glu Thr Cys Glu His Glu Tyr Gly Thr Glu Asp Asp Tyr Gln Gly Leu
 945 950 955 960
 25 Pro Leu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Glu Thr Val Arg Val Glu Glu Glu
 965 970 975
 30 Glu Glu Glu Asp Trp Leu Asp Asp Thr Thr Glu Gln Ser Glu Ile Glu
 980 985 990
 Pro Glu Pro Glu Pro Thr Pro Glu Glu Pro Val Asn Gln Phe Thr Gly
 995 1000 1005
 35 Tyr Leu Lys Leu Thr Asp Asn Val Ala Ile Lys Cys Val Asp Ile
 1010 1015 1020
 40 Val Lys Glu Ala Gln Ser Ala Asn Pro Met Val Ile Val Asn Ala
 1025 1030 1035
 Ala Asn Ile His Leu Lys His Gly Gly Gly Val Ala Gly Ala Leu
 1040 1045 1050
 45 Asn Lys Ala Thr Asn Gly Ala Met Gln Lys Glu Ser Asp Asp Tyr
 1055 1060 1065
 50 Ile Lys Leu Asn Gly Pro Leu Thr Val Gly Gly Ser Cys Leu Leu
 1070 1075 1080
 Ser Gly His Asn Leu Ala Lys Lys Cys Leu His Val Val Gly Pro
 1085 1090 1095
 55 Asn Leu Asn Ala Gly Glu Asp Ile Gln Leu Leu Lys Ala Ala Tyr
 1100 1105 1110

EP 1 694 829 B1

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Glu Asn Phe Asn Ser Gln Asp Ile Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser
 1115 1120 1125
 Ala Gly Ile Phe Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gln Val Cys
 1130 1135 1140
 Val Gln Thr Val Arg Thr Gln Val Tyr Ile Ala Val Asn Asp Lys
 1145 1150 1155
 Ala Leu Tyr Glu Gln Val Val Met Asp Tyr Leu Asp Asn Leu Lys
 1160 1165 1170
 Pro Arg Val Glu Ala Pro Lys Gln Glu Glu Pro Pro Asn Thr Glu
 1175 1180 1185
 Asp Ser Lys Thr Glu Glu Lys Ser Val Val Gln Lys Pro Val Asp
 1190 1195 1200
 Val Lys Pro Lys Ile Lys Ala Cys Ile Asp Glu Val Thr Thr Thr
 1205 1210 1215
 Leu Glu Glu Thr Lys Phe Leu Thr Asn Lys Leu Leu Leu Phe Ala
 1220 1225 1230
 Asp Ile Asn Gly Lys Leu Tyr His Asp Ser Gln Asn Met Leu Arg
 1235 1240 1245
 Gly Glu Asp Met Ser Phe Leu Glu Lys Asp Ala Pro Tyr Met Val
 1250 1255 1260
 Gly Asp Val Ile Thr Ser Gly Asp Ile Thr Cys Val Val Ile Pro
 1265 1270 1275
 Ser Lys Lys Ala Gly Gly Thr Thr Glu Met Leu Ser Arg Ala Leu
 1280 1285 1290
 Lys Lys Val Pro Val Asp Glu Tyr Ile Thr Thr Tyr Pro Gly Gln
 1295 1300 1305
 Gly Cys Ala Gly Tyr Thr Leu Glu Glu Ala Lys Thr Ala Leu Lys
 1310 1315 1320
 Lys Cys Lys Ser Ala Phe Tyr Val Leu Pro Ser Glu Ala Pro Asn
 1325 1330 1335
 Ala Lys Glu Glu Ile Leu Gly Thr Val Ser Trp Asn Leu Arg Glu
 1340 1345 1350
 Met Leu Ala His Ala Glu Glu Thr Arg Lys Leu Met Pro Ile Cys
 1355 1360 1365

EP 1 694 829 B1

Met Asp Val Arg Ala Ile Met Ala Thr Ile Gln Arg Lys Tyr Lys
 1370 1375 1380

5 Gly Ile Lys Ile Gln Glu Gly Ile Val Asp Tyr Gly Val Arg Phe
 1385 1390 1395

10 Phe Phe Tyr Thr Ser Lys Glu Pro Val Ala Ser Ile Ile Thr Lys
 1400 1405 1410

15 Leu Asn Ser Leu Asn Glu Pro Leu Val Thr Met Pro Ile Gly Tyr
 1415 1420 1425

Val Thr His Gly Phe Asn Leu Glu Glu Ala Ala Arg Cys Met Arg
 1430 1435 1440

20 Ser Leu Lys Ala Pro Ala Val Val Ser Val Ser Ser Pro Asp Ala
 1445 1450 1455

Val Thr Thr Tyr Asn Gly Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Lys Thr Ser
 1460 1465 1470

25 Glu Glu His Phe Val Glu Thr Val Ser Leu Ala Gly Ser Tyr Arg
 1475 1480 1485

30 Asp Trp Ser Tyr Ser Gly Gln Arg Thr Glu Leu Gly Val Glu Phe
 1490 1495 1500

Leu Lys Arg Gly Asp Lys Ile Val Tyr His Thr Leu Glu Ser Pro
 1505 1510 1515

35 Val Glu Phe His Leu Asp Gly Glu Val Leu Ser Leu Asp Lys Leu
 1520 1525 1530

40 Lys Ser Leu Leu Ser Leu Arg Glu Val Lys Thr Ile Lys Val Phe
 1535 1540 1545

Thr Thr Val Asp Asn Thr Asn Leu His Thr Gln Leu Val Asp Met
 1550 1555 1560

45 Ser Met Thr Tyr Gly Gln Gln Phe Gly Pro Thr Tyr Leu Asp Gly
 1565 1570 1575

Ala Asp Val Thr Lys Ile Lys Pro His Val Asn His Glu Gly Lys
 1580 1585 1590

50 Thr Phe Phe Val Leu Pro Ser Asp Asp Thr Leu Arg Ser Glu Ala
 1595 1600 1605

55 Phe Glu Tyr Tyr His Thr Leu Asp Glu Ser Phe Leu Gly Arg Tyr
 1610 1615 1620

EP 1 694 829 B1

Met Ser Ala Leu Asn His Thr Lys Lys Trp Lys Phe Pro Gln Val
 1625 1630 1635

5 Gly Gly Leu Thr Ser Ile Lys Trp Ala Asp Asn Asn Cys Tyr Leu
 1640 1645 1650

10 Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Gln Gln Leu Glu Val Lys Phe Asn
 1655 1660 1665

Ala Pro Ala Leu Gln Glu Ala Tyr Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Asp
 1670 1675 1680

15 Ala Ala Asn Phe Cys Ala Leu Ile Leu Ala Tyr Ser Asn Lys Thr
 1685 1690 1695

20 Val Gly Glu Leu Gly Asp Val Arg Glu Thr Met Thr His Leu Leu
 1700 1705 1710

Gln His Ala Asn Leu Glu Ser Ala Lys Arg Val Leu Asn Val Val
 1715 1720 1725

25 Cys Lys His Cys Gly Gln Lys Thr Thr Thr Leu Thr Gly Val Glu
 1730 1735 1740

30 Ala Val Met Tyr Met Gly Thr Leu Ser Tyr Asp Asn Leu Lys Thr
 1745 1750 1755

Gly Val Ser Ile Pro Cys Val Cys Gly Arg Asp Ala Thr Gln Tyr
 1760 1765 1770

35 Leu Val Gln Gln Glu Ser Ser Phe Val Met Met Ser Ala Pro Pro
 1775 1780 1785

40 Ala Glu Tyr Lys Leu Gln Gln Gly Thr Phe Leu Cys Ala Asn Glu
 1790 1795 1800

Tyr Thr Gly Asn Tyr Gln Cys Gly His Tyr Thr His Ile Thr Ala
 1805 1810 1815

45 Lys Glu Thr Leu Tyr Arg Ile Asp Gly Ala His Leu Thr Lys Met
 1820 1825 1830

50 Ser Glu Tyr Lys Gly Pro Val Thr Asp Val Phe Tyr Lys Glu Thr
 1835 1840 1845

Ser Tyr Thr Thr Thr Ile Lys Pro Val Ser Tyr Lys Leu Asp Gly
 1850 1855 1860

55 Val Thr Tyr Thr Glu Ile Glu Pro Lys Leu Asp Gly Tyr Tyr Lys
 1865 1870 1875

EP 1 694 829 B1

Lys Asp Asn Ala Tyr Tyr Thr Glu Gln Pro Ile Asp Leu Val Pro
 1880 1885 1890
 5 Thr Gln Pro Leu Pro Asn Ala Ser Phe Asp Asn Phe Lys Leu Thr
 1895 1900 1905
 Cys Ser Asn Thr Lys Phe Ala Asp Asp Leu Asn Gln Met Thr Gly
 10 1910 1915 1920
 Phe Thr Lys Pro Ala Ser Arg Glu Leu Ser Val Thr Phe Phe Pro
 1925 1930 1935
 15 Asp Leu Asn Gly Asp Val Val Ala Ile Asp Tyr Arg His Tyr Ser
 1940 1945 1950
 Ala Ser Phe Lys Lys Gly Ala Lys Leu Leu His Lys Pro Ile Val
 20 1955 1960 1965
 Trp His Ile Asn Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Phe Lys Pro Asn
 1970 1975 1980
 25 Thr Trp Cys Leu Arg Cys Leu Trp Ser Thr Lys Pro Val Asp Thr
 1985 1990 1995
 Ser Asn Ser Phe Glu Val Leu Ala Val Glu Asp Thr Gln Gly Met
 30 2000 2005 2010
 Asp Asn Leu Ala Cys Glu Ser Gln Gln Pro Thr Ser Glu Glu Val
 2015 2020 2025
 35 Val Glu Asn Pro Thr Ile Gln Lys Glu Val Ile Glu Cys Asp Val
 2030 2035 2040
 Lys Thr Thr Glu Val Val Gly Asn Val Ile Leu Lys Pro Ser Asp
 40 2045 2050 2055
 Glu Gly Val Lys Val Thr Gln Glu Leu Gly His Glu Asp Leu Met
 2060 2065 2070
 45 Ala Ala Tyr Val Glu Asn Thr Ser Ile Thr Ile Lys Lys Pro Asn
 2075 2080 2085
 Glu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Leu Lys Thr Ile Ala Thr His Gly
 50 2090 2095 2100
 Ile Ala Ala Ile Asn Ser Val Pro Trp Ser Lys Ile Leu Ala Tyr
 2105 2110 2115
 55 Val Lys Pro Phe Leu Gly Gln Ala Ala Ile Thr Thr Ser Asn Cys
 2120 2125 2130

EP 1 694 829 B1

Ala Lys Arg Leu Ala Gln Arg Val Phe Asn Asn Tyr Met Pro Tyr
 2135 2140 2145

5 Val Phe Thr Leu Leu Phe Gln Leu Cys Thr Phe Thr Lys Ser Thr
 2150 2155 2160

Asn Ser Arg Ile Arg Ala Ser Leu Pro Thr Thr Ile Ala Lys Asn
 10 2165 2170 2175

Ser Val Lys Ser Val Ala Lys Leu Cys Leu Asp Ala Gly Ile Asn
 15 2180 2185 2190

Tyr Val Lys Ser Pro Lys Phe Ser Lys Leu Phe Thr Ile Ala Met
 2195 2200 2205

Trp Leu Leu Leu Leu Ser Ile Cys Leu Gly Ser Leu Ile Cys Val
 20 2210 2215 2220

Thr Ala Ala Phe Gly Val Leu Leu Ser Asn Phe Gly Ala Pro Ser
 2225 2230 2235

25 Tyr Cys Asn Gly Val Arg Glu Leu Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Val
 2240 2245 2250

Thr Thr Met Asp Phe Cys Glu Gly Ser Phe Pro Cys Ser Ile Cys
 30 2255 2260 2265

Leu Ser Gly Leu Asp Ser Leu Asp Ser Tyr Pro Ala Leu Glu Thr
 2270 2275 2280

35 Ile Gln Val Thr Ile Ser Ser Tyr Lys Leu Asp Leu Thr Ile Leu
 2285 2290 2295

Gly Leu Ala Ala Glu Trp Val Leu Ala Tyr Met Leu Phe Thr Lys
 40 2300 2305 2310

Phe Phe Tyr Leu Leu Gly Leu Ser Ala Ile Met Gln Val Phe Phe
 2315 2320 2325

45 Gly Tyr Phe Ala Ser His Phe Ile Ser Asn Ser Trp Leu Met Trp
 2330 2335 2340

Phe Ile Ile Ser Ile Val Gln Met Ala Pro Val Ser Ala Met Val
 50 2345 2350 2355

Arg Met Tyr Ile Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Tyr Ile Trp Lys Ser
 2360 2365 2370

55 Tyr Val His Ile Met Asp Gly Cys Thr Ser Ser Thr Cys Met Met
 2375 2380 2385

EP 1 694 829 B1

Cys Tyr Lys Arg Asn Arg Ala Thr Arg Val Glu Cys Thr Thr Ile
 2390 2395 2400

5
 Val Asn Gly Met Lys Arg Ser Phe Tyr Val Tyr Ala Asn Gly Gly
 2405 2410 2415

10
 Arg Gly Phe Cys Lys Thr His Asn Trp Asn Cys Leu Asn Cys Asp
 2420 2425 2430

15
 Thr Phe Cys Thr Gly Ser Thr Phe Ile Ser Asp Glu Val Ala Arg
 2435 2440 2445

20
 Asp Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Pro Ile Asn Pro Thr Asp Gln
 2450 2455 2460

25
 Ser Ser Tyr Ile Val Asp Ser Val Ala Val Lys Asn Gly Ala Leu
 2465 2470 2475

30
 His Leu Tyr Phe Asp Lys Ala Gly Gln Lys Thr Tyr Glu Arg His
 2480 2485 2490

35
 Pro Leu Ser His Phe Val Asn Leu Asp Asn Leu Arg Ala Asn Asn
 2495 2500 2505

40
 Thr Lys Gly Ser Leu Pro Ile Asn Val Ile Val Phe Asp Gly Lys
 2510 2515 2520

45
 Ser Lys Cys Asp Glu Ser Ala Ser Lys Ser Ala Ser Val Tyr Tyr
 2525 2530 2535

50
 Ser Gln Leu Met Cys Gln Pro Ile Leu Leu Leu Asp Gln Ala Leu
 2540 2545 2550

55
 Val Ser Asp Val Gly Asp Ser Thr Glu Val Ser Val Lys Met Phe
 2555 2560 2565

60
 Asp Ala Tyr Val Asp Thr Phe Ser Ala Thr Phe Ser Val Pro Met
 2570 2575 2580

65
 Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Ala Thr Ala His Ser Glu Leu Ala
 2585 2590 2595

70
 Lys Gly Val Ala Leu Asp Gly Val Leu Ser Thr Phe Val Ser Ala
 2600 2605 2610

75
 Ala Arg Gln Gly Val Val Asp Thr Asp Val Asp Thr Lys Asp Val
 2615 2620 2625

80
 Ile Glu Cys Leu Lys Leu Ser His His Ser Asp Leu Glu Val Thr
 2630 2635 2640

EP 1 694 829 B1

Gly Asp Ser Cys Asn Asn Phe Met Leu Thr Tyr Asn Lys Val Glu
 2645 2650 2655
 5
 Asn Met Thr Pro Arg Asp Leu Gly Ala Cys Ile Asp Cys Asn Ala
 2660 2665 2670
 Arg His Ile Asn Ala Gln Val Ala Lys Ser His Asn Val Ser Leu
 2675 2680 2685
 10
 Ile Trp Asn Val Lys Asp Tyr Met Ser Leu Ser Glu Gln Leu Arg
 2690 2695 2700
 15
 Lys Gln Ile Arg Ser Ala Ala Lys Lys Asn Asn Ile Pro Phe Arg
 2705 2710
 Leu Thr Cys Ala Thr Thr Arg Gln Val Val Asn Val Ile Thr Thr
 2720 2725 2730
 20
 Lys Ile Ser Leu Lys Gly Gly Lys Ile Val Ser Thr Cys Phe Lys
 2735 2740 2745
 25
 Leu Met Leu Lys Ala Thr Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Leu Val
 2750 2755 2760
 Cys Tyr Ile Val Met Pro Val His Thr Leu Ser Ile His Asp Gly
 2765 2770 2775
 30
 Tyr Thr Asn Glu Ile Ile Gly Tyr Lys Ala Ile Gln Asp Gly Val
 2780 2785 2790
 35
 Thr Arg Asp Ile Ile Ser Thr Asp Asp Cys Phe Ala Asn Lys His
 2795 2800 2805
 Ala Gly Phe Asp Ala Trp Phe Ser Gln Arg Gly Gly Ser Tyr Lys
 2810 2815 2820
 40
 Asn Asp Lys Ser Cys Pro Val Val Ala Ala Ile Ile Thr Arg Glu
 2825 2830 2835
 45
 Ile Gly Phe Ile Val Pro Gly Leu Pro Gly Thr Val Leu Arg Ala
 2840 2845 2850
 Ile Asn Gly Asp Phe Leu His Phe Leu Pro Arg Val Phe Ser Ala
 2855 2860 2865
 50
 Val Gly Asn Ile Cys Tyr Thr Pro Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Ser
 2870 2875 2880
 55
 Asp Phe Ala Thr Ser Ala Cys Val Leu Ala Ala Glu Cys Thr Ile
 2885 2890 2895

EP 1 694 829 B1

Phe Lys Asp Ala Met Gly Lys Pro Val Pro Tyr Cys Tyr Asp Thr
 2900 2905 2910
 5
 Asn Leu Leu Glu Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Glu Leu Arg Pro Asp
 2915 2920 2925
 10
 Thr Arg Tyr Val Leu Met Asp Gly Ser Ile Ile Gln Phe Pro Asn
 2930 2935 2940
 15
 Thr Tyr Leu Glu Gly Ser Val Arg Val Val Thr Thr Phe Asp Ala
 2945 2950 2955
 20
 Glu Tyr Cys Arg His Gly Thr Cys Glu Arg Ser Glu Val Gly Ile
 2960 2965 2970
 25
 Cys Leu Ser Thr Ser Gly Arg Trp Val Leu Asn Asn Glu His Tyr
 2975 2980 2985
 30
 Arg Ala Leu Ser Gly Val Phe Cys Gly Val Asp Ala Met Asn Leu
 2990 2995 3000
 35
 Ile Ala Asn Ile Phe Thr Pro Leu Val Gln Pro Val Gly Ala Leu
 3005 3010 3015
 40
 Asp Val Ser Ala Ser Val Val Ala Gly Gly Ile Ile Ala Ile Leu
 3020 3025 3030
 45
 Val Thr Cys Ala Ala Tyr Tyr Phe Met Lys Phe Arg Arg Val Phe
 3035 3040 3045
 50
 Gly Glu Tyr Asn His Val Val Ala Ala Asn Ala Leu Leu Phe Leu
 3050 3055 3060
 55
 Met Ser Phe Thr Ile Leu Cys Leu Val Pro Ala Tyr Ser Phe Leu
 3065 3070 3075
 60
 Pro Gly Val Tyr Ser Val Phe Tyr Leu Tyr Leu Thr Phe Tyr Phe
 3080 3085 3090
 65
 Thr Asn Asp Val Ser Phe Leu Ala His Leu Gln Trp Phe Ala Met
 3095 3100 3105
 70
 Phe Ser Pro Ile Val Pro Phe Trp Ile Thr Ala Ile Tyr Val Phe
 3110 3115 3120
 75
 Cys Ile Ser Leu Lys His Cys His Trp Phe Phe Asn Asn Tyr Leu
 3125 3130 3135
 80
 Arg Lys Arg Val Met Phe Asn Gly Val Thr Phe Ser Thr Phe Glu
 3140 3145 3150

EP 1 694 829 B1

Glu Ala Ala Leu Cys Thr Phe Leu Leu Asn Lys Glu Met Tyr Leu
 3155 3160 3165
 5
 Lys Leu Arg Ser Glu Thr Leu Leu Pro Leu Thr Gln Tyr Asn Arg
 3170 3175 3180
 Tyr Leu Ala Leu Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr Phe Ser Gly Ala Leu
 3185 3190 3195
 10
 Asp Thr Thr Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Cys Cys His Leu Ala Lys
 3200 3205 3210
 15
 Ala Leu Asn Asp Phe Ser Asn Ser Gly Ala Asp Val Leu Tyr Gln
 3215 3220 3225
 Pro Pro Gln Thr Ser Ile Thr Ser Ala Val Leu Gln Ser Gly Phe
 3230 3235 3240
 20
 Arg Lys Met Ala Phe Pro Ser Gly Lys Val Glu Gly Cys Met Val
 3245 3250 3255
 25
 Gln Val Thr Cys Gly Thr Thr Thr Leu Asn Gly Leu Trp Leu Asp
 3260 3265 3270
 Asp Thr Val Tyr Cys Pro Arg His Val Ile Cys Thr Ala Glu Asp
 3275 3280 3285
 30
 Met Leu Asn Pro Asn Tyr Glu Asp Leu Leu Ile Arg Lys Ser Asn
 3290 3295 3300
 35
 His Ser Phe Leu Val Gln Ala Gly Asn Val Gln Leu Arg Val Ile
 3305 3310 3315
 Gly His Ser Met Gln Asn Cys Leu Leu Arg Leu Lys Val Asp Thr
 3320 3325 3330
 40
 Ser Asn Pro Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Phe Val Arg Ile Gln Pro
 3335 3340 3345
 45
 Gly Gln Thr Phe Ser Val Leu Ala Cys Tyr Asn Gly Ser Pro Ser
 3350 3355 3360
 Gly Val Tyr Gln Cys Ala Met Arg Pro Asn His Thr Ile Lys Gly
 3365 3370 3375
 50
 Ser Phe Leu Asn Gly Ser Cys Gly Ser Val Gly Phe Asn Ile Asp
 3380 3385 3390
 55
 Tyr Asp Cys Val Ser Phe Cys Tyr Met His His Met Glu Leu Pro
 3395 3400 3405

EP 1 694 829 B1

Thr Gly Val His Ala Gly Thr Asp Leu Glu Gly Lys Phe Tyr Gly
 3410 3415 3420
 5 Pro Phe Val Asp Arg Gln Thr Ala Gln Ala Ala Gly Thr Asp Thr
 3425 3430 3435
 Thr Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val Ile
 3440 3445 3450
 10 Asn Gly Asp Arg Trp Phe Leu Asn Arg Phe Thr Thr Thr Leu Asn
 3455 3460 3465
 Asp Phe Asn Leu Val Ala Met Lys Tyr Asn Tyr Glu Pro Leu Thr
 3470 3475 3480
 15 Gln Asp His Val Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ser Ala Gln Thr Gly
 3485 3490 3495
 20 Ile Ala Val Leu Asp Met Cys Ala Ala Leu Lys Glu Leu Leu Gln
 3500 3505 3510
 Asn Gly Met Asn Gly Arg Thr Ile Leu Gly Ser Thr Ile Leu Glu
 3515 3520 3525
 Asp Glu Phe Thr Pro Phe Asp Val Val Arg Gln Cys Ser Gly Val
 3530 3535 3540
 25 Thr Phe Gln Gly Lys Phe Lys Lys Ile Val Lys Gly Thr His His
 3545 3550 3555
 Trp Met Leu Leu Thr Phe Leu Thr Ser Leu Leu Ile Leu Val Gln
 3560 3565 3570
 Ser Thr Gln Trp Ser Leu Phe Phe Phe Val Tyr Glu Asn Ala Phe
 3575 3580 3585
 30 Leu Pro Phe Thr Leu Gly Ile Met Ala Ile Ala Ala Cys Ala Met
 3590 3595 3600
 Leu Leu Val Lys His Lys His Ala Phe Leu Cys Leu Phe Leu Leu
 3605 3610 3615
 Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Tyr Phe Asn Met Val Tyr Met Pro
 3620 3625 3630
 35 Ala Ser Trp Val Met Arg Ile Met Thr Trp Leu Glu Leu Ala Asp
 3635 3640 3645
 Thr Ser Leu Ser Gly Tyr Arg Leu Lys Asp Cys Val Met Tyr Ala
 3650 3655 3660
 55

EP 1 694 829 B1

Ser Ala Leu Val Leu Leu Ile Leu Met Thr Ala Arg Thr Val Tyr
 3665 3670 3675
 5 Asp Asp Ala Ala Arg Arg Val Trp Thr Leu Met Asn Val Ile Thr
 3680 3685 3690
 10 Leu Val Tyr Lys Val Tyr Tyr Gly Asn Ala Leu Asp Gln Ala Ile
 3695 3700 3705
 Ser Met Trp Ala Leu Val Ile Ser Val Thr Ser Asn Tyr Ser Gly
 3710 3715 3720
 15 Val Val Thr Thr Ile Met Phe Leu Ala Arg Ala Ile Val Phe Val
 3725 3730 3735
 20 Cys Val Glu Tyr Tyr Pro Leu Leu Phe Ile Thr Gly Asn Thr Leu
 3740 3745 3750
 Gln Cys Ile Met Leu Val Tyr Cys Phe Leu Gly Tyr Cys Cys Cys
 3755 3760 3765
 25 Cys Tyr Phe Gly Leu Phe Cys Leu Leu Asn Arg Tyr Phe Arg Leu
 3770 3775 3780
 30 Thr Leu Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Val Ser Thr Gln Glu Phe Arg
 3785 3790 3795
 Tyr Met Asn Ser Gln Gly Leu Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ile Asp
 3800 3805 3810
 35 Ala Phe Lys Leu Asn Ile Lys Leu Leu Gly Ile Gly Gly Lys Pro
 3815 3820 3825
 40 Cys Ile Lys Val Ala Thr Val Gln Ser Lys Met Ser Asp Val Lys
 3830 3835 3840
 Cys Thr Ser Val Val Leu Leu Ser Val Leu Gln Gln Leu Arg Val
 3845 3850 3855
 45 Glu Ser Ser Ser Lys Leu Trp Ala Gln Cys Val Gln Leu His Asn
 3860 3865 3870
 50 Asp Ile Leu Leu Ala Lys Asp Thr Thr Glu Ala Phe Glu Lys Met
 3875 3880 3885
 Val Ser Leu Leu Ser Val Leu Leu Ser Met Gln Gly Ala Val Asp
 3890 3895 3900
 55 Ile Asn Arg Leu Cys Glu Glu Met Leu Asp Asn Arg Ala Thr Leu
 3905 3910 3915

EP 1 694 829 B1

Gln Ala Ile Ala Ser Glu Phe Ser Ser Leu Pro Ser Tyr Ala Ala
 3920 3925 3930
 5 Tyr Ala Thr Ala Gln Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Val Ala Asn Gly
 3935 3940 3945
 10 Asp Ser Glu Val Val Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ser Leu Asn Val
 3950 3955 3960
 15 Ala Lys Ser Glu Phe Asp Arg Asp Ala Ala Met Gln Arg Lys Leu
 3965 3970 3975
 20 Glu Lys Met Ala Asp Gln Ala Met Thr Gln Met Tyr Lys Gln Ala
 3980 3985 3990
 Arg Ser Glu Asp Lys Arg Ala Lys Val Thr Ser Ala Met Gln Thr
 3995 4000 4005
 25 Met Leu Phe Thr Met Leu Arg Lys Leu Asp Asn Asp Ala Leu Asn
 4010 4015 4020
 30 Asn Ile Ile Asn Asn Ala Arg Asp Gly Cys Val Pro Leu Asn Ile
 4025 4030 4035
 Ile Pro Leu Thr Thr Ala Ala Lys Leu Met Val Val Val Pro Asp
 4040 4045 4050
 35 Tyr Gly Thr Tyr Lys Asn Thr Cys Asp Gly Asn Thr Phe Thr Tyr
 4055 4060 4065
 Ala Ser Ala Leu Trp Glu Ile Gln Gln Val Val Asp Ala Asp Ser
 4070 4075 4080
 40 Lys Ile Val Gln Leu Ser Glu Ile Asn Met Asp Asn Ser Pro Asn
 4085 4090 4095
 45 Leu Ala Trp Pro Leu Ile Val Thr Ala Leu Arg Ala Asn Ser Ala
 4100 4105 4110
 Val Lys Leu Gln Asn Asn Glu Leu Ser Pro Val Ala Leu Arg Gln
 4115 4120 4125
 50 Met Ser Cys Ala Ala Gly Thr Thr Gln Thr Ala Cys Thr Asp Asp
 4130 4135 4140
 Asn Ala Leu Ala Tyr Tyr Asn Asn Ser Lys Gly Gly Arg Phe Val
 4145 4150 4155
 55 Leu Ala Leu Leu Ser Asp His Gln Asp Leu Lys Trp Ala Arg Phe
 4160 4165 4170

EP 1 694 829 B1

5 Pro Lys Ser Asp Gly Thr Gly Thr Ile Tyr Thr Glu Leu Glu Pro
 4175 4180 4185
 10 Pro Cys Arg Phe Val Thr Asp Thr Pro Lys Gly Pro Lys Val Lys
 4190 4195 4200
 15 Tyr Leu Tyr Phe Ile Lys Gly Leu Asn Asn Leu Asn Arg Gly Met
 4205 4210 4215
 20 Val Leu Gly Ser Leu Ala Ala Thr Val Arg Leu Gln Ala Gly Asn
 4220 4225 4230
 25 Ala Thr Glu Val Pro Ala Asn Ser Thr Val Leu Ser Phe Cys Ala
 4235 4240 4245
 30 Phe Ala Val Asp Pro Ala Lys Ala Tyr Lys Asp Tyr Leu Ala Ser
 4250 4255 4260
 35 Gly Gly Gln Pro Ile Thr Asn Cys Val Lys Met Leu Cys Thr His
 4265 4270 4275
 40 Thr Gly Thr Gly Gln Ala Ile Thr Val Thr Pro Glu Ala Asn Met
 4280 4285 4290
 45 Asp Gln Glu Ser Phe Gly Gly Ala Ser Cys Cys Leu Tyr Cys Arg
 4295 4300 4305
 50 Cys His Ile Asp His Pro Asn Pro Lys Gly Phe Cys Asp Leu Lys
 4310 4315 4320
 55 Gly Lys Tyr Val Gln Ile Pro Thr Thr Cys Ala Asn Asp Pro Val
 4325 4330 4335
 60 Gly Phe Thr Leu Arg Asn Thr Val Cys Thr Val Cys Gly Met Trp
 4340 4345 4350
 65 Lys Gly Tyr Gly Cys Ser Cys Asp Gln Leu Arg Glu Pro Leu Met
 4355 4360 4365
 70 Gln Ser Ala Asp Ala Ser Thr Phe Leu Asn Gly Phe Ala Val
 4370 4375 4380
 75 <210> 75
 <211> 2695
 <212> PRT
 <213> CORONAVIRUS
 80 <400> 75

EP 1 694 829 B1

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

EP 1 694 829 B1

5 Leu Phe Asp Arg Tyr Phe Lys Tyr Trp Asp Gln Thr Tyr His Pro Asn
 275 280 285
 10 Cys Ile Asn Cys Leu Asp Asp Arg Cys Ile Leu His Cys Ala Asn Phe
 290 295 300
 15 Asn Val Leu Phe Ser Thr Val Phe Pro Pro Thr Ser Phe Gly Pro Leu
 305 310 315
 20 Val Arg Lys Ile Phe Val Asp Gly Val Pro Phe Val Val Ser Thr Gly
 325 330 335
 25 Tyr His Phe Arg Glu Leu Gly Val Val His Asn Gln Asp Val Asn Leu
 340 345 350
 30 His Ser Ser Arg Leu Ser Phe Lys Glu Leu Leu Val Tyr Ala Ala Asp
 355 360 365
 35 Pro Ala Met His Ala Ala Ser Gly Asn Leu Leu Leu Asp Lys Arg Thr
 370 375 380
 40 Thr Cys Phe Ser Val Ala Ala Leu Thr Asn Asn Val Ala Phe Gln Thr
 385 390 395
 45 Val Lys Pro Gly Asn Phe Asn Lys Asp Phe Tyr Asp Phe Ala Val Ser
 405 410 415
 50 Lys Gly Phe Phe Lys Glu Gly Ser Ser Val Glu Leu Lys His Phe Phe
 420 425 430
 55 Phe Ala Gln Asp Gly Asn Ala Ala Ile Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Arg
 435 440 445
 60 Tyr Asn Leu Pro Thr Met Cys Asp Ile Arg Gln Leu Leu Phe Val Val
 450 455 460
 65 Glu Val Val Asp Lys Tyr Phe Asp Cys Tyr Asp Gly Gly Cys Ile Asn
 465 470 475
 70 Ala Asn Gln Val Ile Val Asn Asn Leu Asp Lys Ser Ala Gly Phe Pro
 485 490 495
 75 Phe Asn Lys Trp Gly Lys Ala Arg Leu Tyr Tyr Asp Ser Met Ser Tyr
 500 505 510
 80 Glu Asp Gln Asp Ala Leu Phe Ala Tyr Thr Lys Arg Asn Val Ile Pro
 515 520 525
 85 Thr Ile Thr Gln Met Asn Leu Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Lys Asn Arg
 530 535 540

EP 1 694 829 B1

Ala Arg Thr Val Ala Gly Val Ser Ile Cys Ser Thr Met Thr Asn Arg
545 550 555 560

5
Gln Phe His Gln Lys Leu Leu Lys Ser Ile Ala Ala Thr Arg Gly Ala
565 570 575

10
Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Lys Phe Tyr Gly Gly Trp His Asn Met
580 585 590

15
Leu Lys Thr Val Tyr Ser Asp Val Glu Thr Pro His Leu Met Gly Trp
595 600 605

20
Asp Tyr Pro Lys Cys Asp Arg Ala Met Pro Asn Met Leu Arg Ile Met
610 615 620

25
Ala Ser Leu Val Leu Ala Arg Lys His Asn Thr Cys Cys Asn Leu Ser
625 630 635

30
His Arg Phe Tyr Arg Leu Ala Asn Glu Cys Ala Gln Val Leu Ser Glu
645 650 655

35
Met Val Met Cys Gly Gly Ser Leu Tyr Val Lys Pro Gly Gly Thr Ser
660 665 670

40
Ser Gly Asp Ala Thr Thr Ala Tyr Ala Asn Ser Val Phe Asn Ile Cys
675 680 685

45
Gln Ala Val Thr Ala Asn Val Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asp Gly Asn
690 695 700

50
Lys Ile Ala Asp Lys Tyr Val Arg Asn Leu Gln His Arg Leu Tyr Glu
705 710 715 720

55
Cys Leu Tyr Arg Asn Arg Asp Val Asp His Glu Phe Val Asp Glu Phe
725 730 735

60
Tyr Ala Tyr Leu Arg Lys His Phe Ser Met Met Ile Leu Ser Asp Asp
740 745 750

65
Ala Val Val Cys Tyr Asn Ser Asn Tyr Ala Ala Gln Gly Leu Val Ala
755 760 765

70
Ser Ile Lys Asn Phe Lys Ala Val Leu Tyr Tyr Gln Asn Asn Val Phe
770 775 780

75
Met Ser Glu Ala Lys Cys Trp Thr Glu Thr Asp Leu Thr Lys Gly Pro
785 790 795 800

80
His Glu Phe Cys Ser Gln His Thr Met Leu Val Lys Gln Gly Asp Asp
805 810 815

EP 1 694 829 B1

Tyr Val Tyr Leu Pro Tyr Pro Asp Pro Ser Arg Ile Leu Gly Ala Gly
 820 825 830
 5
 Cys Phe Val Asp Asp Ile Val Lys Thr Asp Gly Thr Leu Met Ile Glu
 835 840 845
 Arg Phe Val Ser Leu Ala Ile Asp Ala Tyr Pro Leu Thr Lys His Pro
 850 855 860
 10
 Asn Gln Glu Tyr Ala Asp Val Phe His Leu Tyr Leu Gln Tyr Ile Arg
 865 870 875 880
 15
 Lys Leu His Asp Glu Leu Thr Gly His Met Leu Asp Met Tyr Ser Val
 885 890 895
 Met Leu Thr Asn Asp Asn Thr Ser Arg Tyr Trp Glu Pro Glu Phe Tyr
 900 905 910
 20
 Glu Ala Met Tyr Thr Pro His Thr Val Leu Gln Ala Val Gly Ala Cys
 915 920 925
 25
 Val Leu Cys Asn Ser Gln Thr Ser Leu Arg Cys Gly Ala Cys Ile Arg
 930 935 940
 Arg Pro Phe Leu Cys Cys Lys Cys Cys Tyr Asp His Val Ile Ser Thr
 945 950 955 960
 30
 Ser His Lys Leu Val Leu Ser Val Asn Pro Tyr Val Cys Asn Ala Pro
 965 970 975
 35
 Gly Cys Asp Val Thr Asp Val Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Met Ser
 980 985 990
 Tyr Tyr Cys Lys Ser His Lys Pro Pro Ile Ser Phe Pro Leu Cys Ala
 995 1000 1005
 40
 Asn Gly Gln Val Phe Gly Leu Tyr Lys Asn Thr Cys Val Gly Ser
 1010 1015 1020
 45
 Asp Asn Val Thr Asp Phe Asn Ala Ile Ala Thr Cys Asp Trp Thr
 1025 1030 1035
 Asn Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Ala Asn Thr Cys Thr Glu Arg Leu
 1040 1045 1050
 50
 Lys Leu Phe Ala Ala Glu Thr Leu Lys Ala Thr Glu Glu Thr Phe
 1055 1060 1065
 55
 Lys Leu Ser Tyr Gly Ile Ala Thr Val Arg Glu Val Leu Ser Asp
 1070 1075 1080

EP 1 694 829 B1

Arg Glu Leu His Leu Ser Trp Glu Val Gly Lys Pro Arg Pro Pro
 1085 1090 1095
 5
 Leu Asn Arg Asn Tyr Val Phe Thr Gly Tyr Arg Val Thr Lys Asn
 1100 1105 1110
 Ser Lys Val Gln Ile Gly Glu Tyr Thr Phe Glu Lys Gly Asp Tyr
 1115 1120 1125
 10
 Gly Asp Ala Val Val Tyr Arg Gly Thr Thr Thr Tyr Lys Leu Asn
 1130 1135 1140
 15
 Val Gly Asp Tyr Phe Val Leu Thr Ser His Thr Val Met Pro Leu
 1145 1150 1155
 Ser Ala Pro Thr Leu Val Pro Gln Glu His Tyr Val Arg Ile Thr
 1160 1165 1170
 20
 Gly Leu Tyr Pro Thr Leu Asn Ile Ser Asp Glu Phe Ser Ser Asn
 1175 1180 1185
 25
 Val Ala Asn Tyr Gln Lys Val Gly Met Gln Lys Tyr Ser Thr Leu
 1190 1195 1200
 Gln Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Ser His Phe Ala Ile Gly Leu
 1205 1210 1215
 30
 Ala Leu Tyr Tyr Pro Ser Ala Arg Ile Val Tyr Thr Ala Cys Ser
 1220 1225 1230
 35
 His Ala Ala Val Asp Ala Leu Cys Glu Lys Ala Leu Lys Tyr Leu
 1235 1240 1245
 Pro Ile Asp Lys Cys Ser Arg Ile Ile Pro Ala Arg Ala Arg Val
 1250 1255 1260
 40
 Glu Cys Phe Asp Lys Phe Lys Val Asn Ser Thr Leu Glu Gln Tyr
 1265 1270 1275
 45
 Val Phe Cys Thr Val Asn Ala Leu Pro Glu Thr Thr Ala Asp Ile
 1280 1285 1290
 Val Val Phe Asp Glu Ile Ser Met Ala Thr Asn Tyr Asp Leu Ser
 1295 1300 1305
 50
 Val Val Asn Ala Arg Leu Arg Ala Lys His Tyr Val Tyr Ile Gly
 1310 1315 1320
 55
 Asp Pro Ala Gln Leu Pro Ala Pro Arg Thr Leu Leu Thr Lys Gly
 1325 1330 1335

EP 1 694 829 B1

Thr Leu Glu Pro Glu Tyr Phe Asn Ser Val Cys Arg Leu Met Lys
 1340 1345 1350
 5
 Thr Ile Gly Pro Asp Met Phe Leu Gly Thr Cys Arg Arg Cys Pro
 1355 1360 1365
 Ala Glu Ile Val Asp Thr Val Ser Ala Leu Val Tyr Asp Asn Lys
 1370 1375 1380
 10
 Leu Lys Ala His Lys Asp Lys Ser Ala Gln Cys Phe Lys Met Phe
 1385 1390
 15
 Tyr Lys Gly Val Ile Thr His Asp Val Ser Ser Ala Ile Asn Arg
 1400 1405 1410
 Pro Gln Ile Gly Val Val Arg Glu Phe Leu Thr Arg Asn Pro Ala
 1415 1420 1425
 20
 Trp Arg Lys Ala Val Phe Ile Ser Pro Tyr Asn Ser Gln Asn Ala
 1430 1435 1440
 25
 Val Ala Ser Lys Ile Leu Gly Leu Pro Thr Gln Thr Val Asp Ser
 1445 1450 1455
 Ser Gln Gly Ser Glu Tyr Asp Tyr Val Ile Phe Thr Gln Thr Thr
 1460 1465 1470
 30
 Glu Thr Ala His Ser Cys Asn Val Asn Arg Phe Asn Val Ala Ile
 1475 1480 1485
 35
 Thr Arg Ala Lys Ile Gly Ile Leu Cys Ile Met Ser Asp Arg Asp
 1490 1495 1500
 40
 Leu Tyr Asp Lys Leu Gln Phe Thr Ser Leu Glu Ile Pro Arg Arg
 1505 1510 1515
 Asn Val Ala Thr Leu Gln Ala Glu Asn Val Thr Gly Leu Phe Lys
 1520 1525 1530
 45
 Asp Cys Ser Lys Ile Ile Thr Gly Leu His Pro Thr Gln Ala Pro
 1535 1540 1545
 Thr His Leu Ser Val Asp Ile Lys Phe Lys Thr Glu Gly Leu Cys
 1550 1555 1560
 50
 Val Asp Ile Pro Gly Ile Pro Lys Asp Met Thr Tyr Arg Arg Leu
 1565 1570 1575
 55
 Ile Ser Met Met Gly Phe Lys Met Asn Tyr Gln Val Asn Gly Tyr
 1580 1585 1590

EP 1 694 829 B1

5 Pro Asn Met Phe Ile Thr Arg Glu Glu Ala Ile Arg His Val Arg
 1595 1600 1605
 10 Ala Trp Ile Gly Phe Asp Val Glu Gly Cys His Ala Thr Arg Asp
 1610 1615 1620
 15 Ala Val Gly Thr Asn Leu Pro Leu Gln Leu Gly Phe Ser Thr Gly
 1625 1630
 20 Val Asn Leu Val Ala Val Pro Thr Gly Tyr Val Asp Thr Glu Asn
 1640 1645 1650
 25 Asn Thr Glu Phe Thr Arg Val Asn Ala Lys Pro Pro Pro Gly Asp
 1655 1660 1665
 30 Gln Phe Lys His Leu Ile Pro Leu Met Tyr Lys Gly Leu Pro Trp
 1670 1675 1680
 35 Asn Val Val Arg Ile Lys Ile Val Gln Met Leu Ser Asp Thr Leu
 1685 1690
 40 Lys Gly Leu Ser Asp Arg Val Val Phe Val Leu Trp Ala His Gly
 1700 1705 1710
 45 Phe Glu Leu Thr Ser Met Lys Tyr Phe Val Lys Ile Gly Pro Glu
 1715 1720 1725
 50 Arg Thr Cys Cys Leu Cys Asp Lys Arg Ala Thr Cys Phe Ser Thr
 1730 1735 1740
 55 Ser Ser Asp Thr Tyr Ala Cys Trp Asn His Ser Val Gly Phe Asp
 1745 1750 1755
 60 Tyr Val Tyr Asn Pro Phe Met Ile Asp Val Gln Gln Trp Gly Phe
 1760 1765 1770
 65 Thr Gly Asn Leu Gln Ser Asn His Asp Gln His Cys Gln Val His
 1775 1780 1785
 70 Gly Asn Ala His Val Ala Ser Cys Asp Ala Ile Met Thr Arg Cys
 1790 1795 1800
 75 Leu Ala Val His Glu Cys Phe Val Lys Arg Val Asp Trp Ser Val
 1805 1810 1815
 80 Glu Tyr Pro Ile Ile Gly Asp Glu Leu Arg Val Asn Ser Ala Cys
 1820 1825 1830
 85 Arg Lys Val Gln His Met Val Val Lys Ser Ala Leu Leu Ala Asp
 1835 1840 1845

EP 1 694 829 B1

5 Lys Phe Pro Val Leu His Asp Ile Gly Asn Pro Lys Ala Ile Lys
 1850 1855 1860
 10 Cys Val Pro Gln Ala Glu Val Glu Trp Lys Phe Tyr Asp Ala Gln
 1865 1870 1875
 15 Pro Cys Ser Asp Lys Ala Tyr Lys Ile Glu Glu Leu Phe Tyr Ser
 1880 1885 1890
 20 Tyr Ala Thr His His Asp Lys Phe Thr Asp Gly Val Cys Leu Phe
 1895 1900 1905
 25 Trp Asn Cys Asn Val Asp Arg Tyr Pro Ala Asn Ala Ile Val Cys
 1910 1915 1920
 30 Arg Phe Asp Thr Arg Val Leu Ser Asn Leu Asn Leu Pro Gly Cys
 1925 1930 1935
 35 Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Val Asn Lys His Ala Phe His Thr Pro
 1940 1945 1950
 40 Ala Phe Asp Lys Ser Ala Phe Thr Asn Leu Lys Gln Leu Pro Phe
 1955 1960 1965
 45 Phe Tyr Tyr Ser Asp Ser Pro Cys Glu Ser His Gly Lys Gln Val
 1970 1975 1980
 50 Val Ser Asp Ile Asp Tyr Val Pro Leu Lys Ser Ala Thr Cys Ile
 1985 1990 1995
 55 Thr Arg Cys Asn Leu Gly Gly Ala Val Cys Arg His His Ala Asn
 2000 2005 2010
 60 Glu Tyr Arg Gln Tyr Leu Asp Ala Tyr Asn Met Met Ile Ser Ala
 2015 2020 2025
 65 Gly Phe Ser Leu Trp Ile Tyr Lys Gln Phe Asp Thr Tyr Asn Leu
 2030 2035 2040
 70 Trp Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Ser Leu Glu Asn Val Ala Tyr
 2045 2050 2055
 75 Asn Val Val Asn Lys Gly His Phe Asp Gly His Ala Gly Glu Ala
 2060 2065 2070
 80 Pro Val Ser Ile Ile Asn Asn Ala Val Tyr Thr Lys Val Asp Gly
 2075 2080 2085
 85 Ile Asp Val Glu Ile Phe Glu Asn Lys Thr Thr Leu Pro Val Asn
 2090 2095 2100

EP 1 694 829 B1

Val Ala Phe Glu Leu Trp Ala Lys Arg Asn Ile Lys Pro Val Pro
 2105 2110 2115
 5
 Glu Ile Lys Ile Leu Asn Asn Leu Gly Val Asp Ile Ala Ala Asn
 2120 2125 2130
 Thr Val Ile Trp Asp Tyr Lys Arg Glu Ala Pro Ala His Val Ser
 2135 2140 2145
 10
 Thr Ile Gly Val Cys Thr Met Thr Asp Ile Ala Lys Lys Pro Thr
 2150 2155 2160
 15
 Glu Ser Ala Cys Ser Ser Leu Thr Val Leu Phe Asp Gly Arg Val
 2165 2170 2175
 Glu Gly Gln Val Asp Leu Phe Arg Asn Ala Arg Asn Gly Val Leu
 2180 2185 2190
 20
 Ile Thr Glu Gly Ser Val Lys Gly Leu Thr Pro Ser Lys Gly Pro
 2195 2200 2205
 25
 Ala Gln Ala Ser Val Asn Gly Val Thr Leu Ile Gly Glu Ser Val
 2210 2215 2220
 Lys Thr Gln Phe Asn Tyr Phe Lys Lys Val Asp Gly Ile Ile Gln
 2225 2230 2235
 30
 Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Phe Thr Gln Ser Arg Asp Leu Glu Asp
 2240 2245 2250
 35
 Phe Lys Pro Arg Ser Gln Met Glu Thr Asp Phe Leu Glu Leu Ala
 2255 2260 2265
 Met Asp Glu Phe Ile Gln Arg Tyr Lys Leu Glu Gly Tyr Ala Phe
 2270 2275 2280
 40
 Glu His Ile Val Tyr Gly Asp Phe Ser His Gly Gln Leu Gly Gly
 2285 2290 2295
 45
 Leu His Leu Met Ile Gly Leu Ala Lys Arg Ser Gln Asp Ser Pro
 2300 2305 2310
 Leu Lys Leu Glu Asp Phe Ile Pro Met Asp Ser Thr Val Lys Asn
 2315 2320 2325
 50
 Tyr Phe Ile Thr Asp Ala Gln Thr Gly Ser Ser Lys Cys Val Cys
 2330 2335 2340
 55
 Ser Val Ile Asp Leu Leu Leu Asp Asp Phe Val Glu Ile Ile Lys
 2345 2350 2355

EP 1 694 829 B1

Ser Gln Asp Leu Ser Val Ile Ser Lys Val Val Lys Val Thr Ile
 2360 2365 2370
 5
 Asp Tyr Ala Glu Ile Ser Phe Met Leu Trp Cys Lys Asp Gly His
 2375 2380 2385
 Val Glu Thr Phe Tyr Pro Lys Leu Gln Ala Ser Gln Ala Trp Gln
 2390 2395 2400
 10
 Pro Gly Val Ala Met Pro Asn Leu Tyr Lys Met Gln Arg Met Leu
 2405 2410 2415
 15
 Leu Glu Lys Cys Asp Leu Gln Asn Tyr Gly Glu Asn Ala Val Ile
 2420 2425 2430
 Pro Lys Gly Ile Met Met Asn Val Ala Lys Tyr Thr Gln Leu Cys
 2435 2440 2445
 20
 Gln Tyr Leu Asn Thr Leu Thr Leu Ala Val Pro Tyr Asn Met Arg
 2450 2455 2460
 25
 Val Ile His Phe Gly Ala Gly Ser Asp Lys Gly Val Ala Pro Gly
 2465 2470 2475
 Thr Ala Val Leu Arg Gln Trp Leu Pro Thr Gly Thr Leu Leu Val
 2480 2485 2490
 30
 Asp Ser Asp Leu Asn Asp Phe Val Ser Asp Ala Asp Ser Thr Leu
 2495 2500 2505
 35
 Ile Gly Asp Cys Ala Thr Val His Thr Ala Asn Lys Trp Asp Leu
 2510 2515 2520
 Ile Ile Ser Asp Met Tyr Asp Pro Arg Thr Lys His Val Thr Lys
 2525 2530 2535
 40
 Glu Asn Asp Ser Lys Glu Gly Phe Phe Thr Tyr Leu Cys Gly Phe
 2540 2545 2550
 45
 Ile Lys Gln Lys Leu Ala Leu Gly Gly Ser Ile Ala Val Lys Ile
 2555 2560 2565
 Thr Glu His Ser Trp Asn Ala Asp Leu Tyr Lys Leu Met Gly His
 2570 2575 2580
 50
 Phe Ser Trp Trp Thr Ala Phe Val Thr Asn Val Asn Ala Ser Ser
 2585 2590 2595
 55
 Ser Glu Ala Phe Leu Ile Gly Ala Asn Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
 2600 2605 2610

EP 1 694 829 B1

5
 10
 15
 20

Glu Gln Ile Asp Gly Tyr Thr Met His Ala Asn Tyr Ile Phe Trp
 2615 2620 2625
 Arg Asn Thr Asn Pro Ile Gln Leu Ser Ser Tyr Ser Leu Phe Asp
 2630 2635 2640
 Met Ser Lys Phe Pro Leu Lys Leu Arg Gly Thr Ala Val Met Ser
 2645 2650 2655
 Leu Lys Glu Asn Gln Ile Asn Asp Met Ile Tyr Ser Leu Leu Glu
 2660 2665 2670
 Lys Gly Arg Leu Ile Ile Arg Glu Asn Asn Arg Val Val Val Ser
 2675 2680 2685
 Ser Asp Ile Leu Val Asn Asn
 2690 2695

25
 <210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

30
 <220>
 <223> amorce S/L3/+/4932

<400> 76 20
 ccacacacag cttgtggata 20

35
 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

40
 <220>
 <223> amorce S/L4/+/6401

<400> 77 20
 ccgaagttgt aggcaatgctc 20

45
 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

50
 <220>
 <223> amorce S/L4/+/6964

<400> 78
 tttggtgctc cttctattg 20

55
 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA

EP 1 694 829 B1

<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L4/-/6817

5

<400> 79
ccggcatcca aacataattt 20

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10

<220>
<223> amorce S/L5/-/7633

15

<400> 80
tggtcagtag ggttgattgg 20

20

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

25

<220>
<223> S/L5/-/8127

<400> 81
catccttgt gtcaacatcg 20

30

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35

<220>
<223> amorce S/L5/-/8633

<400> 82
gtcacgagtg acaccatcct 20

40

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

45

<220>
<223> amorce S/L5/+/7839

50

<400> 83
atgcgacgag tctgcttcta 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

55

<220>

EP 1 694 829 B1

<223> amorce S/L5/+/8785

<400> 84
ttcatagtc ctggcttacc 20

5

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10

<220>
<223> amorce S/L5/+/8255

<400> 85
atcttggcgc atgtattgac 20

15

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

20

<220>
<223> amorce S/L6/-/9422

25

<400> 86
tgcattagca gcaacaacat 20

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30

<220>
<223> amorce S/L6/-/9966

35

<400> 87
tctgcagaac agcagaagtg 20

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40

<220>
<223> amorce S/L6/-/10542

45

<400> 88
cctgtgcagt ttgtctgca 20

50

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

55

<220>
<223> amorce S/L6/+/10677

<400> 89

EP 1 694 829 B1

cctgtggca atgaagtaca 20

<210> 90
<211> 20
5 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
10 <223> amorce S/L6/+/10106

<400> 90
atgcatttg cacagcagaa 20

<210> 91
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
20 <223> amorce S/L6/+/9571

<400> 91
ctcaatggt ttgcatggt 20

25 <210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30 <220>
<223> amorce S/L7/-/11271

<400> 92
35 tgcgagctgt catgagaata 20

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40 <220>
<223> amorce S/L7/-/11801

<400> 93
45 aaccgagagc agtaccacag 20

<210> 94
<211> 20
<212> DNA
50 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L7/-/12383

55 <400> 94
tttgctgct gtagcaatg 20

<210> 95

EP 1 694 829 B1

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

5 <220>
<223> amorce S/L7/+12640

<400> 95
ctacgacaga tgtcctgtgc 20

10 <210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

15 <220>
<223> amorce S/L7/+12088

<400> 96
20 gacgaggctg tagctaattg 20

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
25 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L7/+11551

30 <400> 97
ttagctatt gttgctgctg 20

<210> 98
<211> 20
35 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L8/-13160

40 <400> 98
cagacaacat gaagcaccac 20

<210> 99
45 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
50 <223> amorce S/L8/-13704

<400> 99
cgctgacgtg atatatgtgg 20

55 <210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

EP 1 694 829 B1

<220>
<223> amorce S/L8/-/14284

5 <400> 100
tgcaaatga aggatacacc 20

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L8/+/14453

15 <400> 101
acatagctcg cgtctcagtt 20

<210> 102
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L8/+/13968

25 <400> 102
ggcattgtag gcgtactgac 20

<210> 103
30 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
35 <223> amorce S/L8/+/13401

<400> 103
gtttgcggtg taagtgcag 19

40 <210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

45 <220>
<223> amorce S/L9/-/15098

<400> 104
50 tagtggcggc tattgacttc 20

<210> 105
<211> 20
<212> DNA
55 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L9/-/15677

EP 1 694 829 B1

<400> 105
ctaaaccttg agccgcatag 20

5
<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10
<220>
<223> amorce S/L9/-/16247

<400> 106
catggtcata gcagcacttg 20

15
<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

20
<220>
<223> amorce S/L9/+ /16323

<400> 107
ccagggtgtg atgtcactga t 21

25
<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30
<220>
<223> amorce S/L9/+ /15858

<400> 108
ccttaccag atccatcaag 20

35
<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40
<220>
<223> amorce S/L9/+ /15288

45
<400> 109
cgcaaacata aacttgctg 20

50
<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

55
<220>
<223> amorce S/L10/-/16914

<400> 110
agtgtgggt acaagccagt 20

EP 1 694 829 B1

<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
5
<220>
<223> amorce S/L10/-/17466

<400> 111
10 gttccaagga acatgtctgg 20

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L10/-/18022
20
<400> 112
aggTgctgt gtaggatgaa 20

<210> 113
<211> 20
25 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L10/+/18245
30
<400> 113
gggctgtcat gcaactagag 20

<210> 114
35 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
40 <223> amorce S/L10/+/17663

<400> 114
tcttacacgc aatcctgctt 20
45
<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

50 <220>
<223> amorce S/L10/+/17061

<400> 115
55 taccatctg ctgcatagt 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA

EP 1 694 829 B1

<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce S/L11/-/18877

5

<400> 116
gcaagcagaa ttaaccctca 20

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10

<220>
<223> amorce S/L11/-/19396

15

<400> 117
agcaccacct aaattgcatc 20

20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

25

<220>
<223> amorce S/L11/-/20002

<400> 118
tgggccctt gaagtgta 20

30

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35

<220>
<223> amorce S/L11+/20245

<400> 119
tcgaacacat cgtttatgga 20

40

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

45

<220>
<223> amorce S/L11+/19611

50

<400> 120
gaagcacctg ttccatcat 20

<210> 121
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

55

<220>

EP 1 694 829 B1

<223> amorce S/L11+/19021

<400> 121
acgatgctca gccatgtagt 20

5

<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10

<220>
<223> amorce SARS/L1/F3+/800

<400> 122
gaggtgcagt cactcgctat 20

15

<210> 123
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

20

<220>
<223> amorce SARS/L1/F4+/1391

25

<400> 123
cagagattgg acctgagcat 20

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30

<220>
<223> amorce SARS/L1/F5+/1925

35

<400> 124
cagcaaacca ctcaattcct 20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40

<220>
<223> amorce SARS/L1/R3-/1674

45

<400> 125
aaatgatggc aaccttca 20

50

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

55

<220>
<223> amorce SARS/L1/R4-/1107

<400> 126

EP 1 694 829 B1

cacgtggttg aatgactttg 20

<210> 127
<211> 20
5 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
10 <223> amorce SARS/L1/R5/-/520

<400> 127
atttctgcaa ccagctcaac 20

<210> 128
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
20 <223> amorce SARS/L2/F3+/2664

<400> 128
cgcattgtct cctggttac 20

25 <210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30 <220>
<223> amorce SARS/L2/F4+/3232

<400> 129
35 gagattgagc cagaaccaga 20

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
40 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce SARS/L2/F5+/3746

<400> 130
45 atgagcaggt tgtcatgat 20

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
50 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce SARS/L2/R3/-/3579

55 <400> 131
ctgccttaag aagctggatg 20

<210> 132

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

5

<220>
 <223> amorce SARS/L2/R4/-/2991

<400> 132
 tttcttcacc agcatcatca 20

10

<210> 133
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

15

<220>
 <223> amorce SARS/L2/R5/-/2529

<400> 133
 caccgttctt gagaacaacc 20

20

<210> 134
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

25

<220>
 <223> amorce SARS/L3/F3/+/4708

30

<400> 134
 tctttggctg gctcttacag 20

<210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

35

<220>
 <223> amorce SRAS/L3/F4/+/5305

40

<400> 135
 gctggtgatg ctgctaact 20

<210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

45

<220>
 <223> amorce SARS/L3/F5/+/5822

50

<400> 136
 ccatcaagcc tgtgtcgtat 20

55

<210> 137
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

EP 1 694 829 B1

<220>

<223> amorce SARS/L3/R3/-/5610

5 <400> 137
caggtggtgc agacatcata 20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce SARS/L3/R4/-/4988

15 <400> 138
aacatcagca ccatccaagt 20

<210> 139

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce SARS/L3/R5/-/4437

25 <400> 139
atcggacacc atagtcaacg 20

<210> 140

30 <211> 7788

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

35 <223> gène S synthétique

<400> 140

40

45

50

55

EP 1 694 829 B1

	tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
	ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
5	aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
	gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
	gcctggctga ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
10	agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
	ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
15	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
	caatgggctg ggatagcggc ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
	caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacc	660
20	cgccccgttg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc	720
	tcgttttagtg aaccgtcaga tcaactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat	780
	tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggc	840
25	gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa	900
	actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggctttac	960

30

35

40

45

50

55

EP 1 694 829 B1

tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcggg tccaccatgt tcatcttcct 1080
 5 gctgttctg accctgacca gcggcagcga cctggaccgg tgcaccacct tcgacgacgt 1140
 gcaggcccc aactacaccc agcacaccag cagcatgcgg ggcgtgtact accccgacga 1200
 gatctttcgg agcgacaccc tgtacctgac ccaggacctg ttcttgccct tctacagcaa 1260
 10 cgtgaccggc ttccacacca tcaaccacac cttcggcaac cccgtgatcc cttcaagga 1320
 cggcatctac ttgcgccca ccgagaagag caacgtggtg cggggctggg tgttcggcag 1380
 caccatgaac aacaagagcc agagcgtgat catcatcaac aacagcacca acgtggtgat 1440
 15 ccgggcctgc aacttcgagc tgtgcgacaa ccccttcttc gccgtgtcca aaccatggg 1500
 caccagacc cacaccatga tcttcgacaa cgccttcaac tgcaccttcg agtacatcag 1560
 cgacgccttc agcctggacg tgagcgagaa gagcggcaac ttcaagcacc tgcgggagtt 1620
 20 cgtgttcaag aacaaggacg gcttcctgta cgtgtacaag ggctaccagc ccatcgacgt 1680
 ggtgagagac ctgcccagcg gcttcaacac cctgaagccc atcttcaagc tgcccctggg 1740
 catcaacatc accaacttcc gggccatcct gaccgccttt agccctgccc aggacatctg 1800
 25 gggcaccagc gccgccgcct acttcgtggg ctacctgaag cctaccacct tcatgctgaa 1860
 gtacgacgag aacggcacca tcaccgacgc cgtggactgc agccagaacc ccctggccga 1920
 gctgaagtgc agcgtgaaga gcttcgagat cgacaagggc atctaccaga ccagcaactt 1980
 30 cagagtgggtg cctagcggcg atgtggtgcg gttccccaat atcaccaacc tgtgcccctt 2040
 cggcgaagtg ttcaacgcca ccaagttccc cagcgtgtac gcctgggagc ggaagaagat 2100
 cagcaactgc gtggccgact acagcgtgct gtacaactcc accttcttca gcaccttcaa 2160
 35 gtgctacggc gtgagcgcca ccaagctgaa cgacctgtgc ttcagcaacg tgtacgccga 2220
 cagcttcgtg gtgaagggcg acgacgtgag acagatcgcc cctggccaga ccggcgtgat 2280
 cgccgactac aactacaagc tgcccgacga cttcatgggc tgcgtgctgg cctggaacac 2340
 40 ccggaacatc gacgccaaa gcaccggcaa ctacaattac aagtaccgct acctgcccga 2400
 cggcaagctg cggcccttcg agcgggacat ctccaacgtg cccttcagcc ccgacggcaa 2460
 gccctgcacc cccctgccc tgaactgcta ctggcccctg aacgactacg gcttctacac 2520
 45 caccaccggc atcggctatc agccctacag agtggtggtg ctgagcttcg agctgctgaa 2580
 cgcccctgcc accgtgtgcg gccccaagct gagcaccgac ctgatcaaga accagtgcgt 2640
 gaacttcaac ttcaacggcc tgaccggcac cggcgtgctg acccccagca gcaagcgtt 2700
 50 ccagcccttc cagcagttcg gccgggatgt gagcgacttc accgacagcg tgcgggaccc 2760
 caagaccagc gagatcctgg acatcagccc ctgcagcttc ggcggcgtgt ccgtgatcac 2820
 ccccgacacc aacgccagca gcgaagtggc cgtgctgtac caggacgtga actgcaccga 2880
 55 cgtgagcacc gccatccacg ccgaccagct gacccccgcc tggcggatct acagaccgg 2940
 gaacaacgtg ttccagaccc aggccggctg cctgatcggc gccgagcacg tggacaccag 3000

EP 1 694 829 B1

ctacgagtgc gacatcccca ttggcgccgg aatctgcgcc agctaccaca ccgtgagcct 3060
 gctgctggagc accagccaga agtccatcgt ggcctacacc atgagcctgg gcgccgacag 3120
 5 cagcatcgcc tacagcaaca acaccatcgc catccccacc aacttcagca tctccatcac 3180
 caccgaagtg atgcccgtga gcatggccaa gacaagcgtg gattgcaaca tgtacatctg 3240
 cggcgacagc accgagtgcg ccaacctgct gctgcagtac ggcagcttct gcacccagct 3300
 10 gaaccgggccc ctgagcggca tcgccgccga gcaggaccgg aacaccagag aagtgttcgc 3360
 ccaagtgaag cagatgtata agacccccac cctgaagtac ttcgggggct tcaacttctc 3420
 tcagatcctg cccgaccctc tgaagccac caagcgtcc ttcacgagg acctgctggt 3480
 15 caacaaagtg accctggccg acgccggctt tatgaagcag tacggcgagt gcctgggcca 3540
 catcaacgcc cgggacctga tctgcgccc gaagttaac gggctgaccg tgctgcccc 3600
 cctgctgacc gacgacatga tcgccgcta tacagccgcc ctggtgagcg gcaccgccac 3660
 20 cgccggctgg accttcggag ccggagccgc cctgcagatc cccttcgcca tgcatgagc 3720
 ctaccggttc aacggcatcg gcgtgacca gaacgtgctg tacgagaacc agaagcagat 3780
 cgccaaccag ttcaacaagg ccatcagcca gatccaggag agcctgacca caaccagcac 3840
 25 cgccctgggc aagctgcagg acgtggtgaa ccagaacgcc caggccctga acaccctggt 3900
 gaagcagctg agcagcaact tcggcgccat cagctctgtg ctgaacgaca tcctgagcag 3960
 gctggacaaa gtggaggccg aagtgcagat cgaccggctg atcaccggac gcctgcagtc 4020
 30 cctgcagacc tacgtgacct agcagctgat cagagccgcc gagatccggg ccagcgccaa 4080
 tctggccgcc accaagatga gcgagtgcgt gctgggccag agcaagagag tggacttctg 4140
 cggcaagggc tatcacctga tgagcttccc ccaggccgcc cccacggcg tgggtttcct 4200
 35 gcacgtgacc tacgtgccta gccaggagcg gaacttcacc accgccccag ccatctgcca 4260
 cgagggcaag gcctacttcc cccgggaggg cgtgttcgtg tttaacggca ccagctgggt 4320
 catcaccag cgcaacttct tcagccccc gatcatcacc acagacaaca ccttcgtgtc 4380
 40 cggcaactgt gatgtggtga tcggcatcat caataacacc gtgtacgacc ccctgcagcc 4440
 cgagctggac agcttcaagg aggagctgga caaatacttc aagaaccaca cctccccga 4500
 cgtggacctg ggcgatatca gcggcatcaa cgcctccgtg gtgaacatcc agaaggagat 4560
 45 cgacagactg aacgaagtgg ccaagaacct gaacgagagc ctgatcgacc tgaggagct 4620
 gggcaagtac gagcagtaca tcaagtggcc ctggtacgtg tggctgggct tcatcgccgg 4680
 cctgatcgcc atcgtgatgg tgaccatcct gctgtgctgc atgaccagct gctgtagctg 4740
 50 cctgaaaggc gcctgcagct gtggcagctg ctgcaagttc gacgaggacg acagcgagcc 4800
 cgtgctgaag ggcgtgaagc tgcactacac ctgataactc gagaattcac gcgtggtacc 4860
 tctagagtcg acccgggcgg ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagttg 4920
 55 gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 4980
 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 5040

EP 1 694 829 B1

attttatggtt tcaggttcag ggggagatgt gggagggtttt ttaaagcaag taaaacctct 5100
 acaaatgtgg taaaatcgat aaggatccgg gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg 5160
 5 atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gacgcgcctt gtagcggcgc 5220
 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt 5280
 agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg 5340
 10 tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agagctttac ggcacctcga 5400
 ccgcaaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 5460
 ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacggt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 5520
 15 aacaacactc aaccctatct cggctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc 5580
 ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaatattt aacgcgaatt ttaacaaaat 5640
 attaacgttt acaatttcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt 5700
 20 cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc 5760
 cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 5820
 cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat 5880
 25 caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca 5940
 tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 6000
 ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 6060
 30 gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 6120
 cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 6180
 tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 6240
 35 tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 6300
 cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac 6360
 tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtacagaaa 6420
 40 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgag tgctgccata accatgagtg 6480
 ataactgct gcccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 6540
 ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 6600
 45 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 6660
 gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 6720
 tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct ggctggttta 6780
 50 ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gactggggc 6840
 cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 6900
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt 6960
 55 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 7020
 ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 7080

EP 1 694 829 B1

5
 10
 15
 20

cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	7140
ttctgcgcg	aatctgctgc	ttgcaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	7200
tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	7260
taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	7320
caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	7380
agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	7440
gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	7500
gatactaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	7560
ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	7620
acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	7680
tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	7740
ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatggctcg	acagatct		7788

25
 <210> 141
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

30
 <220>
 <223> amorce SNE-S1

<400> 141 23
 ggttgggatt atccaaaatg tga 23

35
 <210> 142
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

40
 <220>
 <223> amorce SNE-AS1

<400> 142 24
 gcatcatcag aaagaatcat catg 24

45
 <210> 143
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

50
 <220>
 <223> amorce SAR1-S

55
 <400> 143
 cctctctgt tcttgctgc a 21

<210> 144
 <211> 21

EP 1 694 829 B1

<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
5 <223> amorce SAR1-AS

<400> 144
tatagtgagc cgccacacat g 21

10 <210> 145
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial sequence

15 <220>
<223> amorce PCR

<400> 145
20 ataggatcca ccatgtttat tttcttatta tttcttactc tcaact 45

<210> 146
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

25 <220>
<223> amorce PCR

<400> 146
30 atactcgagt tatgtgtaat gtaatttgac acccttg 37

<210> 147
<211> 45
<212> DNA
35 <213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

40 <400> 147
ataggatcca ccatgtttat tttcttatta tttcttactc tcaact 45

<210> 148
<211> 36
45 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

50 <400> 148
acctccggat ttaatatt gctcatattt tcccaa 36

<210> 149
55 <211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

EP 1 694 829 B1

<220>

<223> extrémité N-terminale de la protéine S du SRAS-CoV (acides amines 1 à 13)

<400> 149

5

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly
1 5 10

10

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> oligopeptide

<400> 150

20

Ser Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 10

25

<210> 151

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> amorce PCR

<400> 151

actagctagc ggatccacca tgttcatctt cctg 34

35

<210> 152

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> amorce PCR

<400> 152

agtatccgga cttgatgtac tgctcgact tgc 33

45

<210> 153

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial sequence

50

<220>

<223> oligonucléotide

55

<400> 153

tatgagcttt tttttttt ttttttggc atataaatag actcggcgcg ccatctgca 59

<210> 154

<211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 5 <220>
 <223> oligonucléotide
 <400> 154
 gatggcgcgc cgagtctatt tatatgccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagc tca 53
 10
 <210> 155
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 15
 <220>
 <223> amorce PCR
 <400> 155
 20 atacgtacga ccatgtttat ttcttatta ttcttactc tcact 45
 <210> 156
 <211> 40
 <212> DNA
 25 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> amorce PCR
 30 <400> 156
 atagcgcgct cattatgtgt aatgtaattt gacacccttg 40
 <210> 157
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> amorce PCR
 40
 <400> 157
 ccatttcaac aattggccg 20
 <210> 158
 45 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 50 <223> amorce PCR
 <400> 158
 ataggatccg cgcgctcatt atttaccgtc gtcacttta taatc 45
 55

Revendications

1. Souche isolée ou purifiée de coronavirus humain associé au syndrome respiratoire aigu sévère, **caractérisée en**

EP 1 694 829 B1

ce que son génome présente sous la forme d'ADN complémentaire un codon sérine en position 23220-23222 du gène de la protéine S ou un codon glycine en position 25298-25300 du gène de l'ORF3, et un codon alanine en position 7918-7920 de l'ORF1a ou un codon sérine en position 26857-26859 du gène de la protéine M, lesdites positions étant indiquées en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

- 5
2. Souche isolée ou purifiée de coronavirus selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** l'équivalent ADN de son génome présente une séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 1.
- 10
3. Polynucléotide isolé ou purifié, **caractérisé en ce que** sa séquence est celle du génome de la souche isolée de coronavirus selon la revendication 1 ou la revendication 2.
- 15
4. Polynucléotide isolé ou purifié selon la revendication 3, **caractérisé en ce que** sa séquence est la SEQ ID NO : 1.
5. Fragment du polynucléotide selon la revendication 3, **caractérisé en ce qu'il** comprend les ou est constitué des bases ou paires de bases consécutives des positions 7919 à 23220, 7919 à 25298, 16622 à 23220, 19064 à 23220, 16622 à 25298, 19064 à 25298, 23220 à 24872, 23220 à 26857, 24872 à 25298, ou 25298 à 26857.
- 20
6. Réactif de détection d'un coronavirus associé au SRAS, **caractérisé en ce qu'il** est sélectionné dans le groupe constitué par une souche isolée de coronavirus selon la revendication 1 ou la revendication 2 et un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 3, 4 et 5.
- 25
7. Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par :
- (a) une souche isolée de coronavirus selon la revendication 1 ou la revendication 2,
(b) un polynucléotide selon la revendication 3, la revendication 4 ou la revendication 5,
- pour la préparation d'un réactif de détection et éventuellement de génotypage d'un coronavirus associé au SRAS.
- 30
8. Kit ou coffret de détection d'un coronavirus associé au SRAS, **caractérisé en ce qu'il** comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par :
- une souche isolée de coronavirus selon la revendication 1 ou la revendication 2 et,
- un polynucléotide selon la revendication 3, la revendication 4 ou la revendication 5.

35

Claims

- 40
1. Isolated or purified strain of human coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, **characterised in that** its genome exhibits, in the form of complementary DNA, a serine codon at position 23220-23222 of the gene for the S protein or a glycine codon at position 25298-25300 of the gene for ORF3, and an alanine codon at position 7918-7920 for ORF1a or a serine codon at position 26857-26859 of the gene for the M protein, said positions being indicated with reference to GenBank sequence AY274119.3.
- 45
2. Isolated or purified coronavirus strain according to Claim 1, **characterised in that** the DNA equivalent of its genome exhibits a sequence corresponding to sequence SEQ ID No. 1.
- 50
3. Isolated or purified polynucleotide, **characterised in that** its sequence is that of the genome of the isolated coronavirus strain according to Claim 1 or Claim 2.
- 55
4. Isolated or purified polynucleotide according to Claim 3, **characterised in that** its sequence is SEQ ID No. 1.
5. Fragment of the polynucleotide according to Claim 3, **characterised in that** it includes or is constituted by the consecutive bases or base pairs of positions 7919 to 23220, 7919 to 25298, 16622 to 23220, 19064 to 23220, 16622 to 25298, 19064 to 25298, 23220 to 24872, 23220 to 26857, 24872 to 25298, or 25298 to 26857.
6. Reagent for detection of a coronavirus associated with SARS, **characterised in that** it is selected from the group constituted by an isolated coronavirus strain according to Claim 1 or Claim 2 and a polynucleotide according to any one of Claims 3, 4 and 5.

7. Use of a product selected from the group constituted by

- (a) an isolated coronavirus strain according to Claim 1 or Claim 2,
- (b) a polynucleotide according to Claim 3, Claim 4 or Claim 5,

for the preparation of a detection reagent and possibly for genotyping of a coronavirus associated with SARS.

8. Kit or box for detecting a coronavirus associated with SARS, **characterised in that** it includes at least one reagent selected from the group constituted by:

- an isolated coronavirus strain according to Claim 1 or Claim 2 and,
- a polynucleotide according to Claim 3, Claim 4 or Claim 5.

Patentansprüche

1. Isolierter oder gereinigter humaner Coronavirusstamm, der mit dem Schweren Akuten Respiratorischen Syndrom assoziiert ist, **dadurch gekennzeichnet, dass** sein Genom in Form von komplementärer DNA an Position 23220-23222 des Gens für das S-Protein ein Serincodon oder an Position 25298-25300 des Gens für den ORF3 ein Glycincodon, und ein Alanincodon an Position 7918-7920 von ORF1a oder ein Serincodon an Position 26857-26859 des Gens für das M-Protein hat, wobei die Positionen in Bezug auf die Genbanksequenz AY274119.3 angegeben sind.

2. Isolierter oder gereinigter Coronavirusstamm nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die DNA, die seinem Genom äquivalent ist, eine Sequenz hat, die der Sequenz SEQ ID NO:1 entspricht.

3. Isoliertes oder gereinigtes Polynukleotid, **dadurch gekennzeichnet, dass** seine Sequenz jene des Genoms des isolierten Coronavirusstamms nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 ist.

4. Isoliertes oder gereinigtes Polynukleotid nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** seine Sequenz SEQ ID NO: 1 ist.

5. Fragment des Polynukleotids nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** es die aufeinanderfolgenden Basen oder Basenpaare der Positionen 7919 bis 23220, 7919 bis 25298, 16622 bis 23220, 19064 bis 23220, 16622 bis 25298, 19064 bis 25298, 23220 bis 24872, 23220 bis 26857, 24872 bis 25298 oder 25298 bis 26857 umfasst oder aus diesen besteht.

6. Reagenz zum Nachweis eines mit SARS assoziierten Coronavirus, **dadurch gekennzeichnet, dass** es ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem isolierten Coronavirusstamm nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 und einem Polynukleotid nach einem der Ansprüche 3, 4 und 5.

7. Verwendung eines Produktes ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einem isolierten Coronavirusstamm nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
- (b) einem Polynukleotid nach Anspruch 3, Anspruch 4 oder Anspruch 5,

zur Herstellung eines Reagenzes zum Nachweis und gegebenenfalls zur Genotypisierung eines mit SARS assoziierten Coronavirus.

8. Kit oder Set zum Nachweis eines mit SARS assoziierten Coronavirus, **dadurch gekennzeichnet, dass** es wenigstens ein Reagenz umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- einem isolierten Coronavirusstamm nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, und
- einem Polynukleotid nach Anspruch 3, Anspruch 4 oder Anspruch 5.

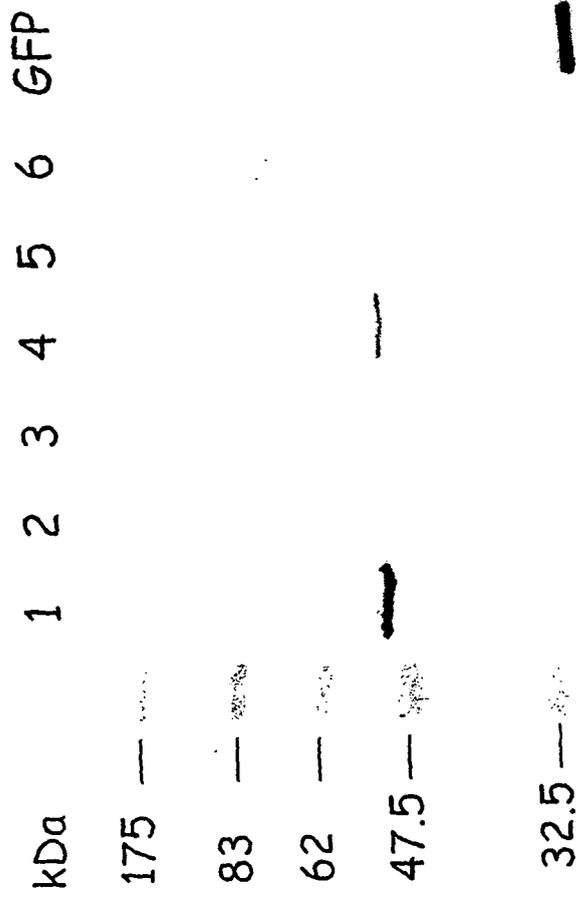


FIGURE 1

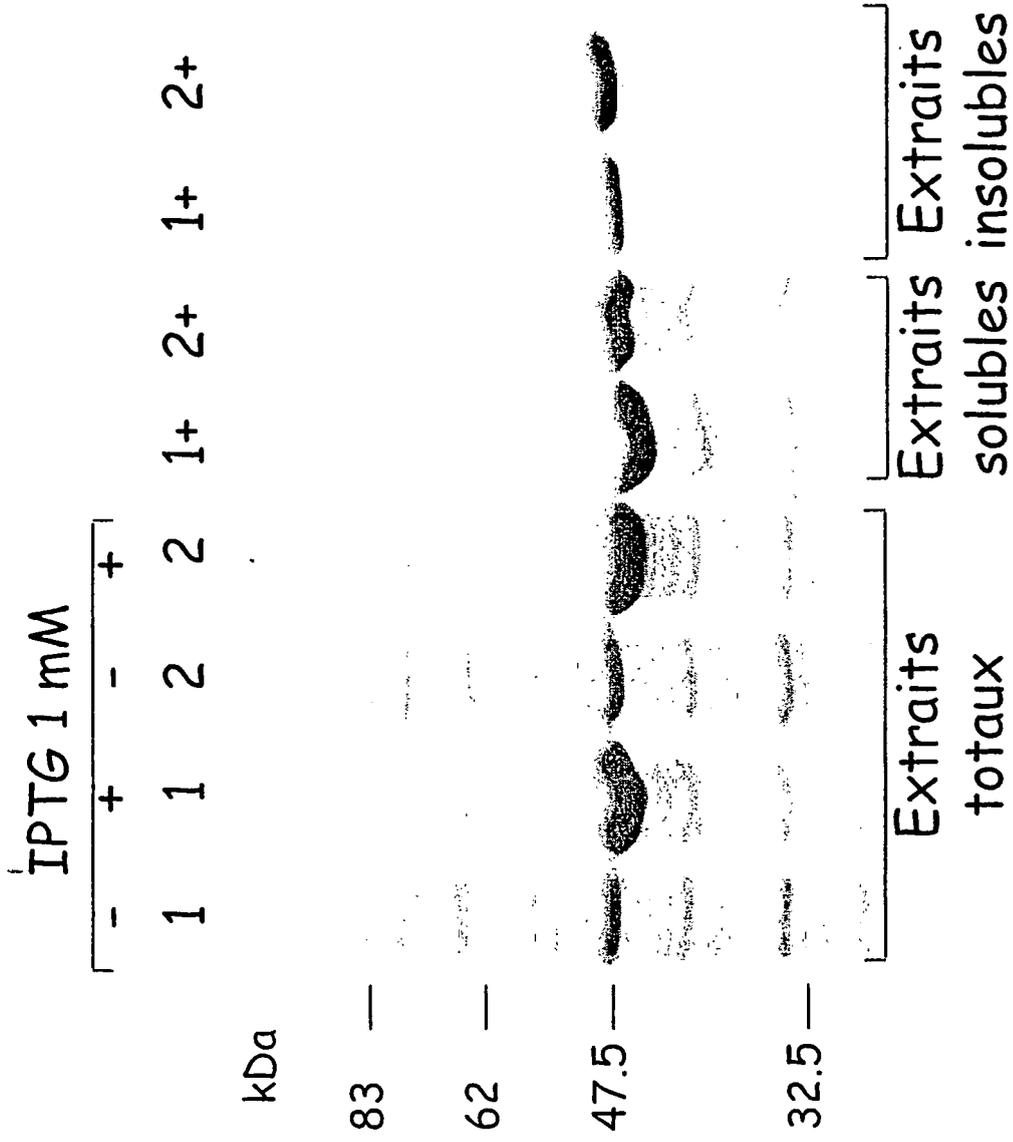


FIGURE 2

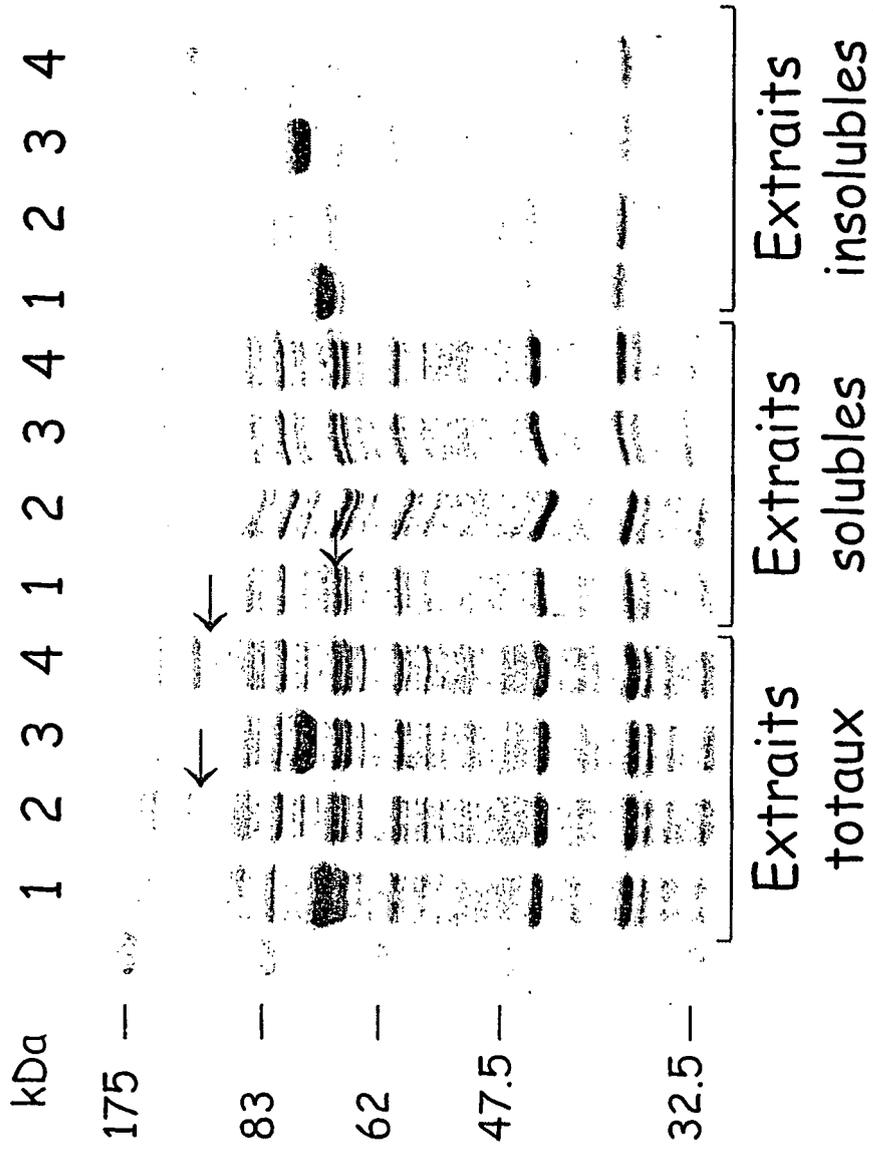


FIGURE 3

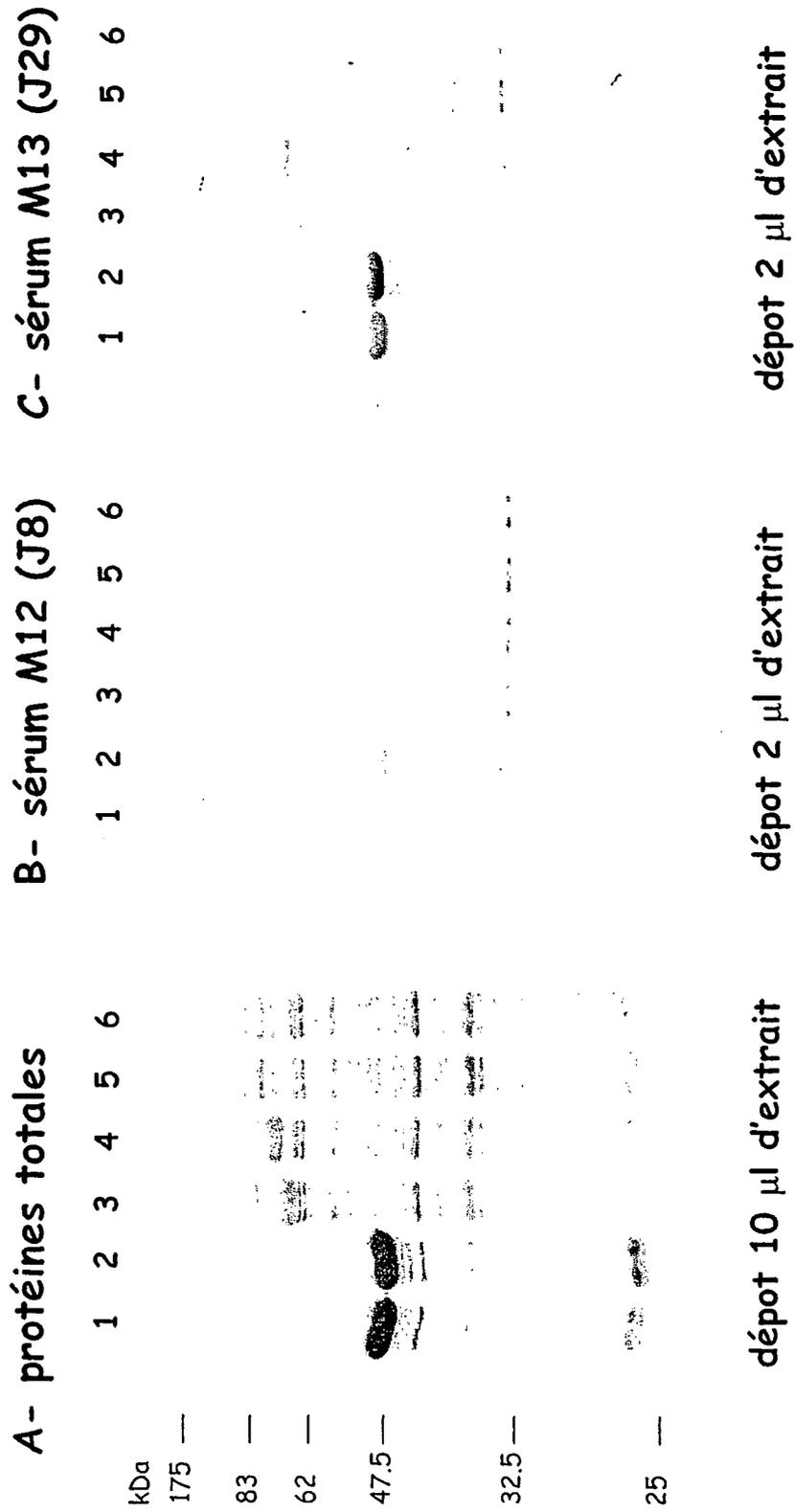


FIGURE 4

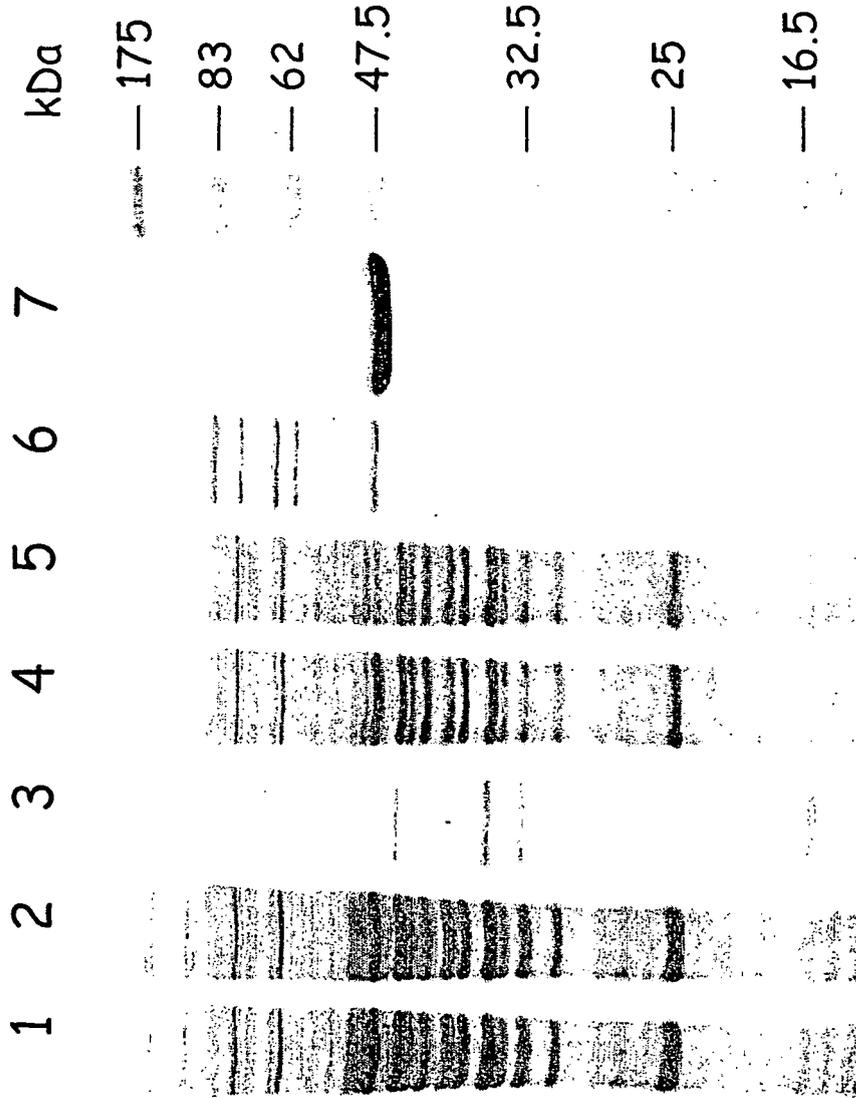


FIGURE 5

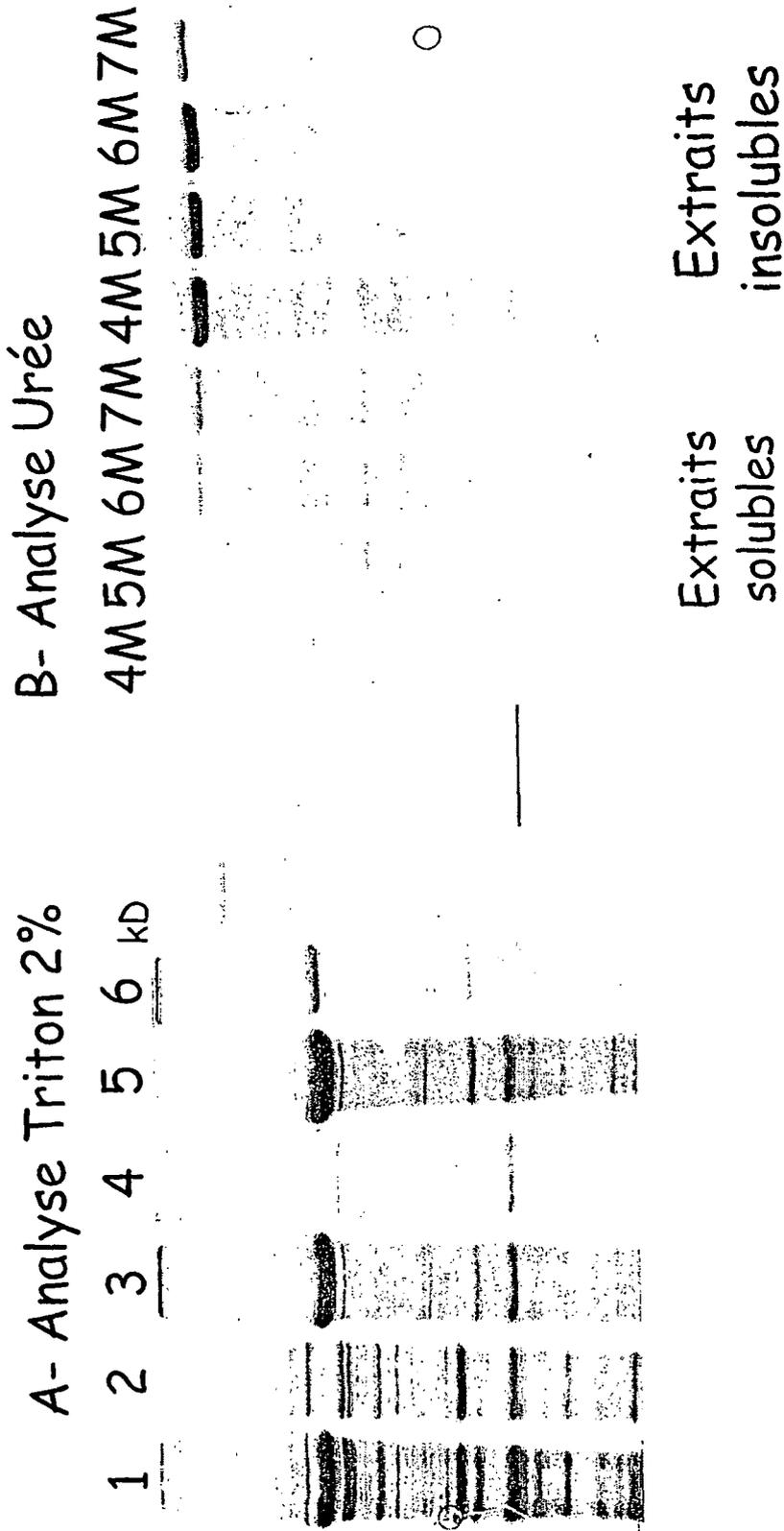


FIGURE 6

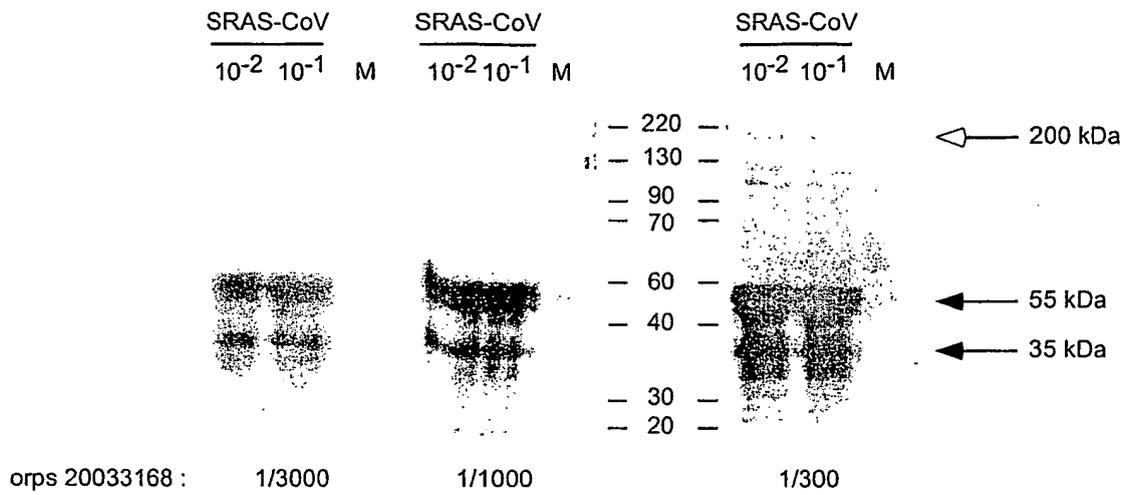


FIGURE 7

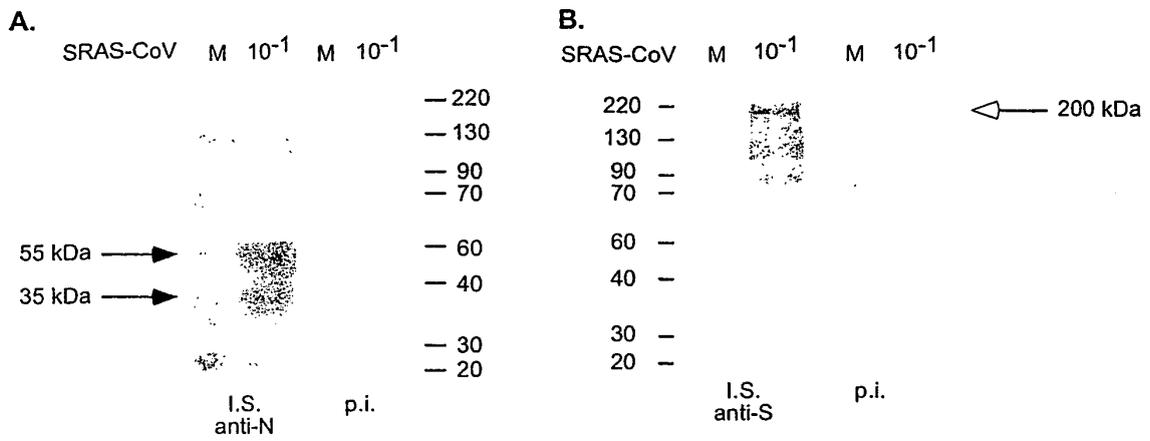
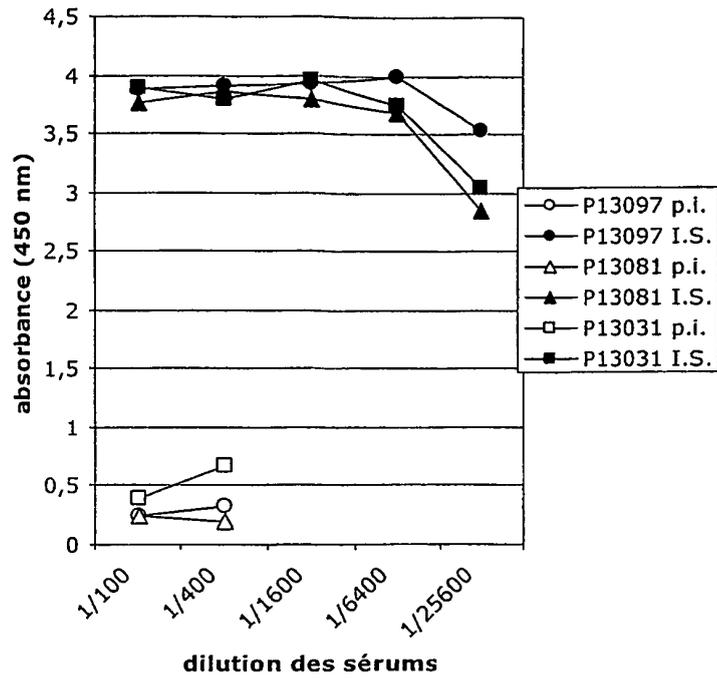


FIGURE 8

A



B

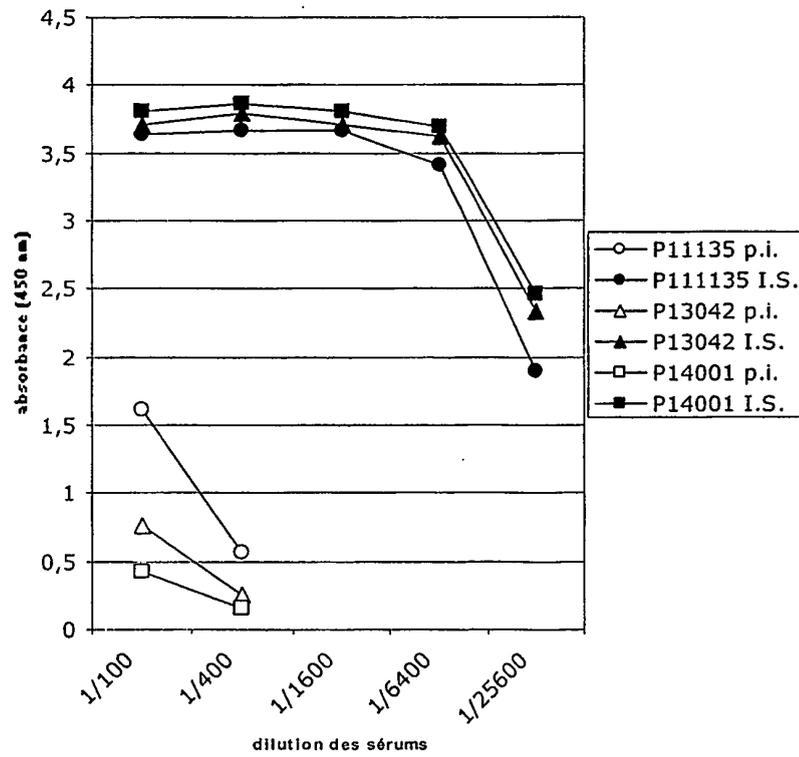


FIGURE 9

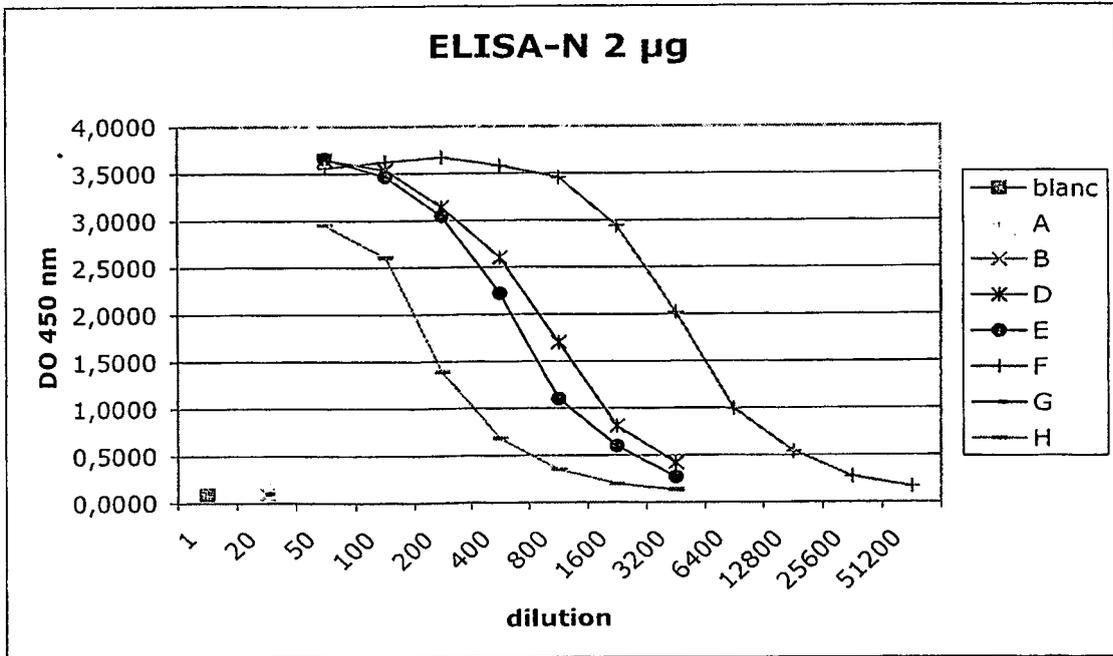
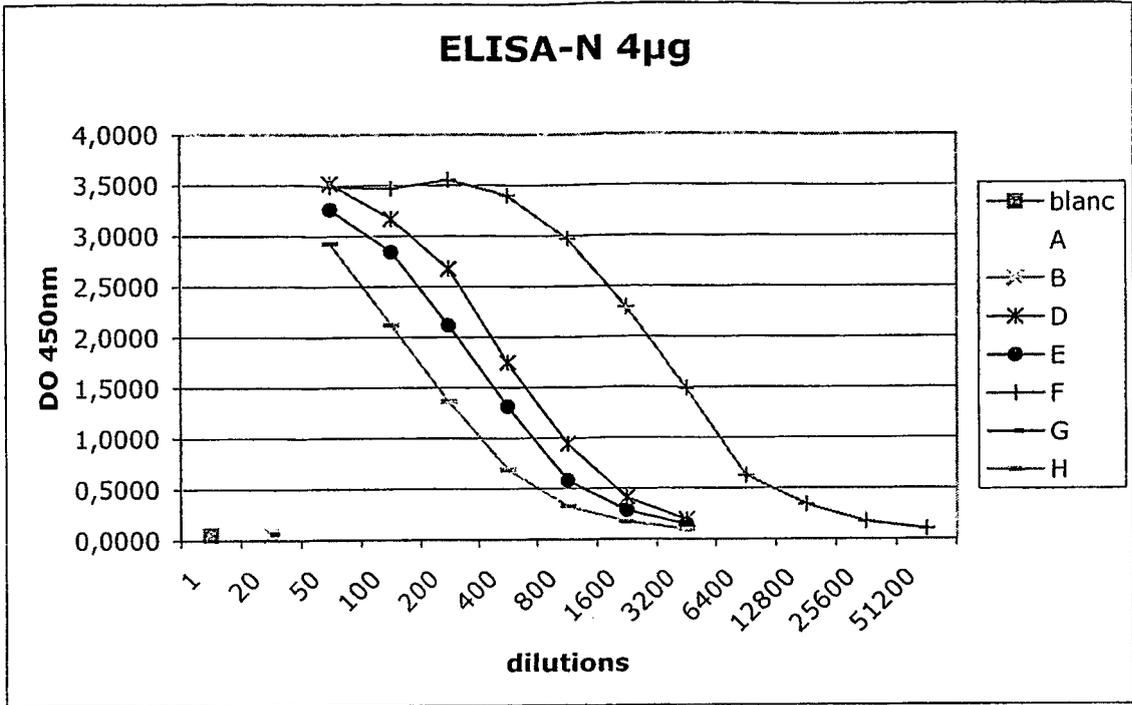


FIGURE 10a

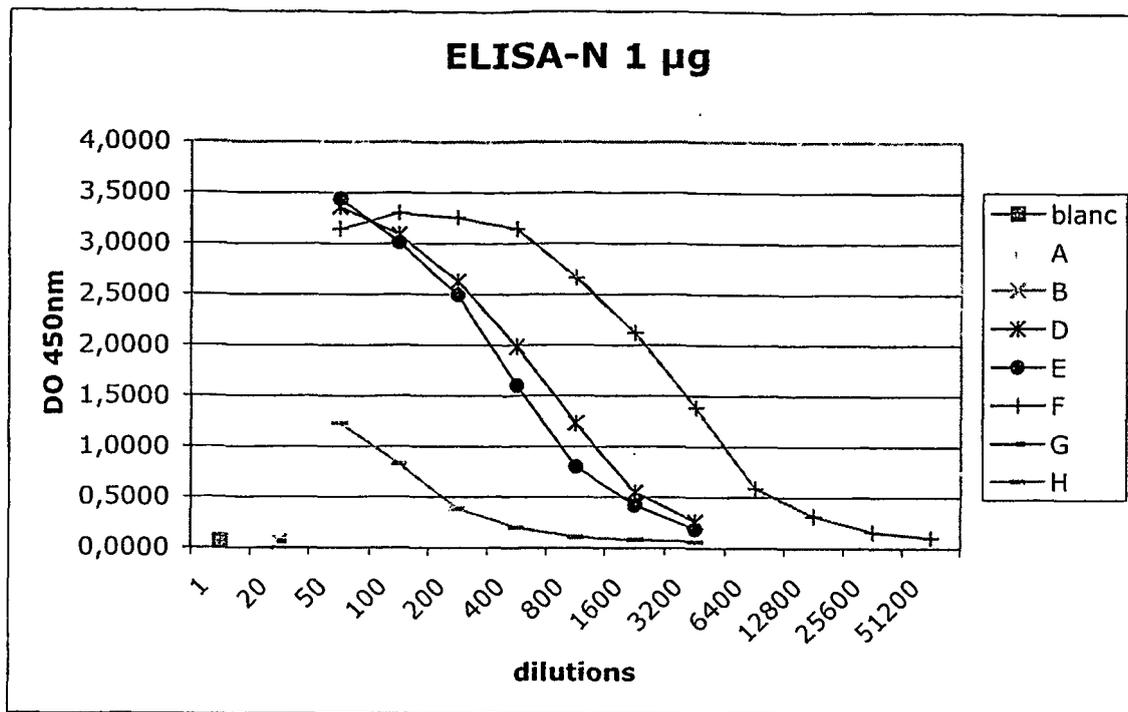


FIGURE 10b

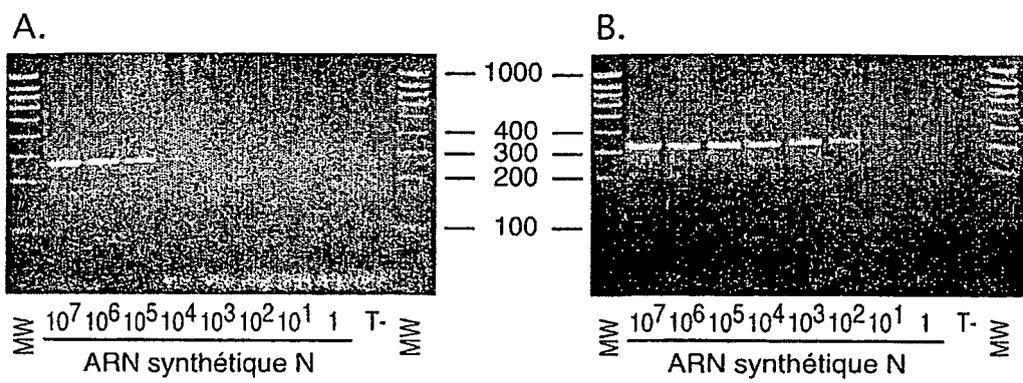


FIGURE 11

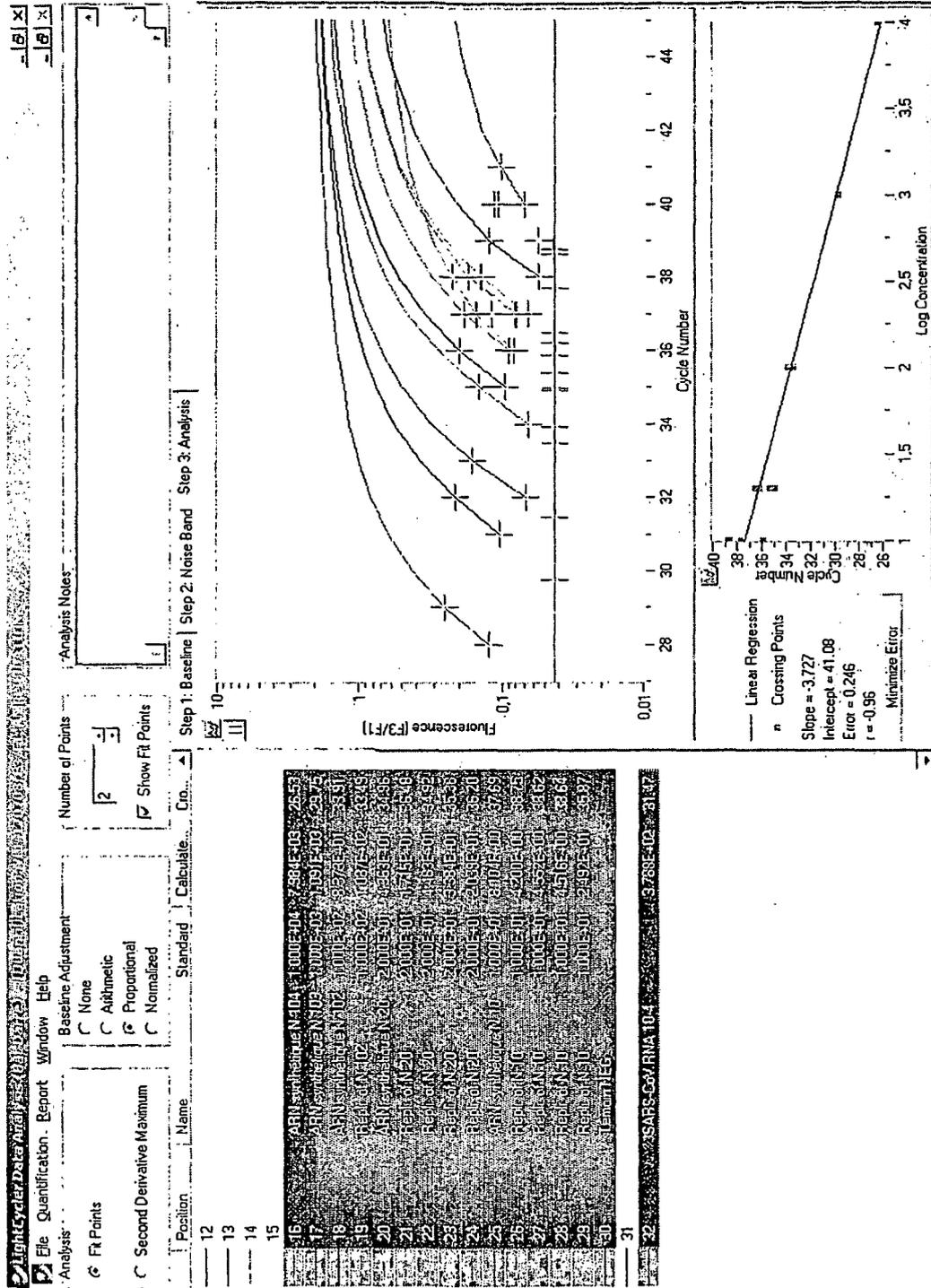


FIGURE 12

EP 1 694 829 B1

```

                                >> XhoII
                                >> Sau3AI
                                >> NdeII
                                >> MflI
                                >> MboI
                                >> DpnII
                                >> MnlI>> DpnI
                                >> BstYI
                                >> BspAI
                                >> Bsp143I
                                >> BglII
                                >> VneI
                                >> SphI
                                >> SnoI
                                >> RmaI
                                >> PaeI >> SduI
                                >> NspI >> NspII
                                >> NspHI >> HgiAI
                                >> NlaIII >> Bsp1286I
                                >> MaeI >> BmyI
                                >> ApaLI
                                >> Alw44I
                                >> Alw21I
                                >> SfcI
                                >> PstI
                                >> MnlI
                                >> Ksp632I
                                >> EarI
                                >> Eam1104I
                                >> HindII >> MboII >> EarI
                                >> HincII >> MaeIII >> Eam1104I
                                >> TthHB8I >> StyI
                                >> TaqI >> RmaI >> ScrFI
                                >> Sau3AI >> MaeI >> NciI
                                >> NdeII >> EcoT14I >> MspI
                                >> MboI >> Eco130I >> MaeIII
                                >> DpnII >> BssT1I >> HpaII
                                >> DpnI >> BsaJI >> HapII
                                >> BspAI >> BlnI >> DsaV
                                >> Bsp143I >> AvrII >> BcnI
                                >> Esp3I >> MaeII
                                >> HindII >> MaeII> < Eco57I >> BsmAI >> MaeI
                                >> HincII > < AflIII > < DdeI >> Alw26I >> BsmBI
                                >> RmaI
                                >> Esp3I >> MaeII
                                >> BsmAI >> MaeI
                                >> Alw26I >> BsmBI

ATATTAGGTT TTTACCTACC CAGGAAAAGC CAACCAACCT CGATCTCTTG TAGATCTGTT CTCTAAACGA
    10          20          30          40          50          60          70

                                >> VneI
                                >> SphI
                                >> SnoI
                                >> RmaI
                                >> PaeI >> SduI
                                >> NspI >> NspII
                                >> NspHI >> HgiAI
                                >> NlaIII >> Bsp1286I
                                >> MaeI >> BmyI
                                >> ApaLI
                                >> Alw44I
                                >> Alw21I
                                >> SfcI
                                >> PstI
                                >> MnlI
                                >> Ksp632I
                                >> EarI
                                >> Eam1104I
                                >> HindII >> MboII >> EarI
                                >> HincII >> MaeIII >> Eam1104I
                                >> TthHB8I >> StyI
                                >> TaqI >> RmaI >> ScrFI
                                >> Sau3AI >> MaeI >> NciI
                                >> NdeII >> EcoT14I >> MspI
                                >> MboI >> Eco130I >> MaeIII
                                >> DpnII >> BssT1I >> HpaII
                                >> DpnI >> BsaJI >> HapII
                                >> BspAI >> BlnI >> DsaV
                                >> Bsp143I >> AvrII >> BcnI
                                >> Esp3I >> MaeII
                                >> HindII >> MaeII> < Eco57I >> BsmAI >> MaeI
                                >> HincII > < AflIII > < DdeI >> Alw26I >> BsmBI

ACTTTAAAT CTGTGTAGCT GTCGCTCGGC TGCATGCCTA GTGCACCTAC GCAGTATAAA CAATAATAAA
    80          90          100          110          120          130          140

                                >> SfcI
                                >> PstI
                                >> MnlI
                                >> Ksp632I
                                >> EarI
                                >> Eam1104I
                                >> HindII >> MboII >> EarI
                                >> HincII >> MaeIII >> Eam1104I
                                >> TthHB8I >> StyI
                                >> TaqI >> RmaI >> ScrFI
                                >> Sau3AI >> MaeI >> NciI
                                >> NdeII >> EcoT14I >> MspI
                                >> MboI >> Eco130I >> MaeIII
                                >> DpnII >> BssT1I >> HpaII
                                >> DpnI >> BsaJI >> HapII
                                >> BspAI >> BlnI >> DsaV
                                >> Bsp143I >> AvrII >> BcnI
                                >> Esp3I >> MaeII
                                >> HindII >> MaeII> < Eco57I >> BsmAI >> MaeI
                                >> HincII > < AflIII > < DdeI >> Alw26I >> BsmBI

TGCAGTCGAT CATCAGCATA CCTAGGTTTC GTCCGGGTGT GACCGAAAGG TAAGATGGAG AGCCTTGTTT
    220          230          240          250          260          270          280

                                >> RmaI
                                >> Esp3I >> MaeII
                                >> BsmAI >> MaeI
                                >> Alw26I >> BsmBI

TTGGTGTCAA CGAGAAAACA CACGTCCAAC TCAGTTTGCC TGTCCCTCAG GTTAGAGACG TGCTAGTGCC
    290          300          310          320          330          340          350

```

FIGURE 13.1

EP 1 694 829 B1

```

    >< Sau96I
      >< PssI
        >< Pali
          >< NspIV
            >< MnlI
              >< HaeIII
                >< EcoO109I
                  >< DraII>< MboII >< PmlI
                    >< MnlI >< Cfr13I >< PmaCI
                      >< Ksp632I >< BsuRI >< MaeII
                        >< HinfI >< BsiZI>< EcoNI >< Eco72I
                          >< EarI >< BshI >< BslI >< BsaAI
                            >< PleI >< Eam1104I>< AsuI >< BsiYI>< BbrPI >< MnlI
TGGCTTCGGG GACTCTGTGG AAGAGGCCCT ATCGGAGGCA CGTGAACACC TCAAAAATGG CACTTGTGGT
    360          370          380          390          400          410          420

    >< RmaI >< RsaI >< Tru9I
    >< MaeI >< AluI >< Csp6I >< BspWI >< SfaNI
    CTAGTAGAGC TGGAAAAAGG CGTACTGCCC CAGCTTGAAC AGCCCTATGT GTTCATTAAG CGTTCTGATG
    430          440          450          460          470          480          490

    >< Pali >< RsaI
    >< HaeIII >< McrI ><
    >< Tru9I >< GdiII >< Csp6I
    >< MseI >< EaeI >< BsmI BsiEI ><
    >< Esp4I >< BsuRI >< BsiEI ><
    >< AflIII >< BshI >< AluI >< BscCI >< AfaI
    CCTTAAGCAC CAATCACGGC CACAAGGTTCG TTAGAGCTGGT TGCAGAAATG GACGGCATTC AGTACGGTCC
    500          510          520          530          540          550          560

    >< NspI
    >< ScaI >< NspHI
    >< RsaI >< NlaIII
    >< Csp6I >< BslI
    >< BsrI >< BsiYI >< MboII
    >< AciI >< AfaI >< AflIII >< MunI >< AciI
    TAGCGGTATA AACTGGGAG TACTCGTGCC ACATGTGGGC GAAACCCCAA TTGCATACCG CAATGTTCTT
    570          580          590          600          610          620          630

    >< TthHB8I
    >< TaqI
    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< ClaI
    >< Bsu15I
    >< BspDI
    >< BspAI
    >< Bsp143I
    >< Bsp106I
    >< BsiXI >< MaeIII >
    >< BscI>< SfaNI DdeI ><
    >< BscBI >< AluI >< BanIII >< BfrI ><
    CTCGTAAGA ACGTAATAA GGGAGCCGGT GGTCATAGCT ATGGCATCGA TCTAAAGTCT TATGACTTAG
    640          650          660          670          680          690          700

```

FIGURE 13.2

EP 1 694 829 B1

```

    >> Sau3AI
    >> NdeII
    >> MboI
    >> HphI
    >> DpnII
    >> BspAI
    >> AlwI>> DpnI
    >> AluI
    >> Bsp143I
    >> MboII
    >> BsrI
    >> DdeI
    >> VneI >>
    >> SnoI >>
    >> NlaIII
    >> ApaLI >>
    >> Alw44I >>
GTGACGAGCT TGGCACTGAT CCCATTGAAG ATTATGAACA AACTGGAAC ACTAAGCATG GCAGTGGTGC
  710          720          730          740          750          760          770

    >> SstI
    >> SduI
    >> SacI
    >> NspII
    >> MnlI
    >> HgiAI
    >> Eco24I
    >> Eco136II
    >> Bsp1286I
    >> BmyI
    >> BanII
    >> Alw21I
    >> AluI
    >> MaeIII
    >> AccI
    >> TthHB8I
    >> TaqI
    >> SalI
    >> RtrI
    >> HindII
    >> HincII
    >> BsgI
    >> Sau96I >>
    >> Pali >>
    >> NspIV >>
    >> HaeIII >>
    >> Cfr13I >>
    >> BsuRI >>
    >> BsiZI >>
    >> BshI >>
    >> AsuI >>
ACTCCGTGAA CTCACTCGTG AGCTCAATGG AGGTGCAGTC ACTCGCTATG TCGACAACAA TTTCTGTGGC
  780          790          800          810          820          830          840

    >> ThaI
    >> ThaI
    >> MvnI
    >> MvnI
    >> HinPII
    >> Hin6I
    >> HhaI
    >> CfoI
    >> BstUI
    >> BstUI
    >> Bsp50I
    >> Bsp50I
    >> AciI
    >> AccII
    >> Acc65I
    >> MnlI
    >> SfaNI
    >> AccII
    >> VneI
    >> SnoI
    >> SduI
    >> NspII >>
    >> HgiAI >>
    >> Bsp1286I >>
    >> BmyI
    >> ApaLI
    >> Alw44I
    >> Alw21I >>
CCAGATGGGT ACCCTCTTGA TTGCATCAAA GATTTTCTCG CACGCGCGGG CAAGTCAATG TGCACCTTTT
  850          860          870          880          890          900          910

    >> TthHB8I
    >> TthHB8I
    >> TaqI
    >> TaqI
    >> MnlI
    >> Ksp632I
    >> HinfI>> PleI
    >> Eam1104I
    >> EarI
    >> BbvI>> AccI
    >> Fnu4HI
    >> MboII
    >> MaeIII
    >> EcoRII >>
    >> DsaV >>
CCGAACAAC TATTACATC GAGTCGAAGA GAGGTGTCTA CTGCTGCCGT GACCATGAGC ATGAAATTGC
  920          930          940          950          960          970          980

    >> TthHB8I
    >> TaqI
    >> SfuI
    >> NspV>> Tru9I
    >> LspI>> MseI
>> ScrFI
>> HinPII

```

FIGURE 13.3

EP 1 694 829 B1

```

>< MvaI      >< Hin6I      >< SduI      >< Csp45I
>< Ecl136I   >< HhaI      >< NspII     >< BstBI
>< BstOI     >< HaeII     >< HgiAI     >< Bsp119I
>< BstNI     >< Eco47III  >< Bsp1286I >< BsiCI
>< BsiLI     >< CfoI      >< BmyI      >< Bpu14I
>< ApyI >< DdeI >< Bsp143II >< AluI    >< Alw21I    >< AsuII
CTGGTTCACT GAGCGCTCTG ATAAGAGCTA CGAGCACCAG ACACCCTTCG AAATTAAGAG TGCCAAGAAA
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< MnlI
>< BsmI
>< BscCI
TTTGACACTT TCAAAGGGGA ATGCCCAAAG TTTGTGTTTC CTCTTAACTC AAAAGTCAAA GTCATTCAAC
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120

>< PmlI
>< PmaCI
>< MaeII
>< Eco72I
>< BsaAI
>< BbrPI
>< AflIII    >< MnlI>< DdeI
CACGTGTTGA AAAGAAAAAG ACTGAGGGTT TCATGGGGCG TATACGCTCT GTGTACCCTG TTGCATCTCC
      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190

>< SfaNI
>< MaeIII    >< AccI
ACAGGAGTGT AACAAATATGC ACTTGCTCTAC CTTGATGAAA TGTAATCATT GCGATGAAGT TTCATGGCAG
      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                PssI ><
                                >< Psp5II
                                >< PpuMI
                                >< NspIV
                                >< NspHII
                                >< Eco47I
                                >< DraII
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                >< Bme18I
                                >< AvaII
                                >< AsuI

>< MaeII
ACGTGCGACT TTCTGAAAGC CACTTGTGAA CATTGTGGCA CTGAAAATTT AGTTATTGAA GGACCTACTA
      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330

                                Eco0109I ><AflIII >
                                Van91I ><
                                SinI ><
                                Sau96I ><
                                PflMI ><
                                NspIV ><
                                NspHII >
                                Eco47I ><
                                Cfr13I ><
                                BslI ><
                                BsiZI ><
                                BsiYI ><
                                Bme18I ><
                                AvaII ><
                                AsuI ><

>< RsaI
>< NspI
>< NlaIV
>< NlaIII
>< NspHI>< KpnI
>< Eco64I
>< Csp6I
>< BscBI
>< BanI
>< Asp718
>< AfaI
>< AccB1I

```

FIGURE 13. 4

EP 1 694 829 B1

```

    >< Acc65I          >< SfcI          >< NlaIII         AccB7I ><
CATGTGGGTA CCTACCTACT AATGCTGTAG TGAAATGCC ATGTCTGCC TGCAAGACC CAGAGATTGG
    1340          1350          1360          1370          1380          1390          1400

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI>< MnlI
                                >< HinfI
    >< DdeI          >< PleI          >< AciI
ACCTGAGCAT AGTGTTCAG ATTATCACAA CCACTCAAAC ATTGAAACTC GACTCCGCAA GGGAGGTAGG
    1410          1420          1430          1440          1450          1460          1470

    >< RmaI          NlaIV ><
    >< MnlI          >< BsrI
    >< MaeI          >< BbvI          >< Fnu4HI         BscBI ><
ACTAGATGTT TTGGAGGCTG TGTGTTT GCC TATGTTGGCT GCTATAATAA GCGTGCCTAC TGGGTTCCTC
    1480          1490          1500          1510          1520          1530          1540

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                NdeII ><
                                MflI ><
                                MboI ><
                                >< MaeIII
                                >< Eco31I         DpnII ><
                                >< BsrI          >< MnlI DpnI ><
    >< RmaI          >< BsuRI >< BsrI          >< BsmAI         BstYI ><
    >< MnlI          >< DdeI >< BspWI         >< BsaI>< HphI BspAI ><
    >< MaeI          >< BshI>< BglI         >< Alw26I         Bsp143I ><
GTGCTAGTGC TGATATTGGC TCAGGCCATA CTGGCATTAC TGGTGACAAT GTGGAGACCT TGAATGAGGA
    1550          1560          1570          1580          1590          1600          1610

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< MaeII >< Tru9I
                                >< HpaI          >< MnlI
                                >< HindII         >< Ksp632I
                                >< HinfI >< PleI >< HincII         >< EarI
    >< AlwI >< DdeI >< AflIII >< MseI          >< Eam1104I
TCTCCTTGAG ATACTGAGTC GTGAACGTGT TAACATTAAC ATTGTTGGCG ATTTTCATTT GAATGAAGAG
    1620          1630          1640          1650          1660          1670          1680

                                >< MboII          PleI ><
                                >< BstXI          >< SfaNI          >< HinfI
GTTGCCATCA TTTTGGCATC TTTCTCTGCT TCTACAAGTG CCTTTATTGA CACTATAAAG AGTCTTGATT
    1690          1700          1710          1720          1730          1740          1750

                                >< StyI
                                >< MaeIII
                                >< EcoT14I
                                >< Eco130I
                                >< PleI          >< BssT1I         BslI ><
                                >< MaeIII         >< BsaJI          BsiYI ><
    >< HinfI>< AciI          >< BsaJI          BsiYI ><
ACAAGTCTTT CAAAACCATT GTTGAGTCCT GCGGTAAC TAAGTTACC AAGGGAAAGC CCGTAAAAGG
    1760          1770          1780          1790          1800          1810          1820

                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                >< DpnII
                                >< DpnI >< Tru9I
                                >< BspAI >< MseI
                                >< Bsp143I
                                >< Van91I
                                >< PflMI
                                >< DraIII
                                >< BslI
                                >< BsiYI
                                >< BbvI
                                >< AccB7I
                                >< MnlI
                                Fnu4HI ><

```

FIGURE 135

EP 1 694 829 B1

```

TGCTTGAAC ATTGGACAAC AGAGATCAGT TTTAACACCA CTGTGTGGTT TTCCCTCACA GGCTGCTGGT
 1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890

                << ThaI
                << SfaNI
                << MvnI
                << HinPII
                << HinPII
                << Hin6I
                << Hin6I
                << HhaI
                << HhaI
                << Sau3AI
                << NdeII
                << MboI
                << DpnII
                << DpnI
                << BspAI
                << Bsp143I
                << CfoI
                << CfoI
                << BstUI
                << BssHII
                << Bsp50I
                << AccII
                << Fnu4HI
                << BbvI
                PvuII >
                Psp5I >
                NspBII >
                HphI <<
                Fnu4HI <<
                AluI >
GTTATCAGAT CAATTTTTGC GCGCACACTT GATGCAGCAA ACCACTCAAT TCCTGATTGG CAAAGAGCAG
 1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960

                << TthHB8I
                << StyI
                << NcoI
                << HindII
                << HincII
                << HinII
                << EcoT14I
                << Eco57I
                << TaqI>< Ecol30I
                << SalI << DsaI
                << RtrI << BssT1I
                << BsaHI
                << BbiII>< NlaIII
                << AclI << HgaI
                << MaeIII
                << BbvI
                << MaeII << AccI>< BsaJI HphI <<
CTGTCACCAT ACTTGATGGT ATTTCTGAAC AGTCATTACG TCTTGTGCGAC GCCATGGTTT ATACTTCAGA
 1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030

                << RsaI
                << NdeI
                << Csp6I
                << BspMI
                << MaeIII << BsrI << AfaI << DdeI
CCTGCTCACC AACAGTGTCA TTATTATGGC ATATGTAACT GGTGGTCTTG TACAACAGAC TTCTCAGTGG
 2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100

                << StuI
                << Pali
                << HaeIII
                << Ecol47I
                << SduI
                << DdeI
                << NspII
                << BsuRI
                << Bsp1286I
                << BshI
                << BmyI
                << AatI
                > < MnlI
                DdeI <<
                BfrI <<
TTGTCTAATC TTTTGGGCAC TACTGTTGAA AAACCTCAGGC CTATCTTTGA ATGGATTGAG GCGAAACTTA
 2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170

                << TfiI
                << Hinfi
                << FokI
                Tth111I <<
                AspI <<
GTGCAGGAGT TGAATTTCTC AAGGATGCTT GGGAGATTCT CAAATTTCTC ATTACAGGTG TTTTGGACAT
 2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240

```

FIGURE 13.6

EP 1 694 829 B1

```

Tru9I <<
MseI <<
HpaI >
HindII >
HincII >
    << Eco57I
CGTCAAGGGT CAAATACAGG TTGCTTCAGA TAACATCAAG GATTGTGTAA AATGCTTCAT TGATGTTGTT
    2250          2260          2270          2280          2290          2300          2310

    << Sau3AI
    << NdeII
    << MboI
        > < MaeIII
            << FbaI
            << DpnII
            << DpnI
            << BspAI
            << Bsp143I
                << TthHB8I
                << TaqI
AACAAGGCAC TCGAAATGTG CATTGATCAA GTCACATATCG CTGGCGCAAA GTTGCATCA CTCAACTTAG
    2320          2330          2340          2350          2360          2370          2380

    << Sau3AI
    << NdeII
    << DpnII
        << DpnIMboII >>
            DdeI >>
                << HinP1I
                << Hin6I
                << HhaI
                << CfoI
                << BspAI
                << MboIBfrI >>
                << Bsp143I
                << BsiQI
                << BclI
                << HpaI
                << BbsI >>
                << PvuII
                << Psp5I
                << Bst1107I
                << BsaAI
                << BbvI
                << Fnu4HI >>
                > < Fnu4HI
                << AluI
                << HphI
                << DrdI
                << AccI
                << BbvI
                << BbvI
                << HphI
                << ScaI
                << RsaI
                << NlaIII MnlI >>
                << NlaIII >> BanI
                << AflIII
                << TfiI
                << Csp6I
                << BbvI
                << AccB1I
                << MaeIII
                << HinfI
                << HphI
                << AfaI
ACTCATGCCT CTTAAGGCAC CAAAAGAAGT AACCTTCTT GAAGGTGATT CACATGACAC AGTACTTACC
    2460          2470          2480          2490          2500          2510          2520

        > < XhoI
        << TthHB8I
        << TthHB8I >> TaqI
            > < S1aI
            > < Paer7I
            > < NspIII
            << HphI >> Hin1I
            > < Eco88I
            > < CcrI
            << Esp3I >> BsaHI
            > < BcoI
            << BsmAI >> BbiII
            > < AvaI
            >> HgaI
            << TaqI > < Ama87I >> BsmBI
            << Alw26I >> AcyI
            << AluI
    << DdeI >> MnlI
TCTGAGGAGG TTGTTCTCAA GAACGGTGAA CTCGAAGCAC TCGAGACGCC CGTTGATAGC TTCACAAATG
    2530          2540          2550          2560          2570          2580          2590

```

FIGURE 13.7

EP 1 694 829 B1

```

                >< Pali >< NlaIII
                >< HaeIII >< MnlI
                >< BsuRI >< DdeI >< Tru9I
                >< BshI >< BfrI >< MseI
>< AluI          >< BsrI          ATGGCCTCAT GCTCTTAGAG ATTAAGGACA AAGAACAATA
GAGCTATCGT TGGCACACCA GTCTGTGTAA 2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660

                >< VneI
                Tru9I ><
                >< SnoI
                >< SduI
                >< NspII
                MseI ><
                >< HgiAI
                Bsp1286I ><BslI ><
                BsiYI ><
                >< BmyI
                >< ApaLI
                >< Tru9I >< Alw44I
                >< MseI >< Alw21I
CTGCGCATTG TCTCCTGGTT TACTGGCTAC AAACAATGTC TTTCGCTTAA AAGGGGGTGC ACCAATTTAAA
2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730

                >< TfiI
>< MaeIII          >< MboII > < MaeIII          >< HinfI AluI ><
GGTGTAACCT TTGGAGAAGA TACTGTTTGG GAAGTTCAAG GTTACAAGAA TGTGAGAATC ACATTTGAGC
2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800

                >< RsaI
                >< NlaIV
                MaeIII ><
                >< MspI>< KpnI
                >< HpaII
                >< HapII
                > < Eco64I
                >< SduI >< Csp6I
                >< NspII >< TfiI >< BscBI
                >< HgiAI > < BanI
                >< Bsp1286I > < Asp718
                >< BmyI >< HinfI >< AfaI
                >< Alw21I > < AccB1I
                >< AflIII >< MseI >< AccI > < Acc65I
TTGATGAACG TGTTGACAAA GTGCTTAATG AAAAGTGCTC TGTCTACACT GTTGAATCCG GTACCGAAGT
2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboI
                >< DpnII
                > < DpnI
                >< NspI
                >< NspHI
                >< NlaIII          >< MboII >< BspAI
                >< DdeI >< MnlI >< AlwNI >< BbsI >< AlwNI
TACTGAGTTT GCATGTGTTG TAGCAGAGGC TGTGTGAAG ACTTTACAAC CAGTTTCTGA TCTCCTTACC
2880      2890      2900      2910      2920      2930      2940

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BspAI

```

FIGURE 13.8

EP 1 694 829 B1

```

    << NlaIII>< Bsp143I          << AluI          << SfaNI
AACATGGGTA TTAGCTTTGA TGAGTGGAGT GTAGCTACAT TCTACTTATT TGATGATGCT GGTGAAGAAA
    2950          2960          2970          2980          2990          3000          3010

                                << SfaNI
                                << MnlI
    << MboII          << GsuI          << Ksp632I          << MnlI
                                << EarI          > < MboII
                                << Eam1104I
    << HphI          << MaeII>< BpmI          << MnlI          << MboII
ACTTTTCATC ACGTATGTAT TGTTCCTTTT ACCCTCCAGA TGAGGAAGAA GAGGACGATG CAGAGTGTGA
    3020          3030          3040          3050          3060          3070          3080

                                > < RsaI
                                << RsaI
    << NlaIII
                                << MnlI          << FokI
                                << Csp6I          Eco31I >>
                                << Csp6I          << MamI BsmAI >>
                                > < AfaI          << BsiBI BsaI >>
                                << MboII          << BsaB1Alw26I >>
GGAAGAAGAA ATTGATGAAA CCTGTGAACA TGAGTACGGT ACAGAGGATG ATTATCAAGG TCTCCCTCTG
    3090          3100          3110          3120          3130          3140          3150

    << NlaIV>< PvuII>< XmnI
    << Eco64I >< Psp5I          << TthHB8I
    << MnlI >< DdeI          << TaqI          << MnlI          << MboII
    << BscBI>< NspBII >< MnlI          << Ksp632I          << MboII >< MboII
    << BanI          << MnlI          << EarI          << BsrI
    << AccB1I >< AluI >< Asp700I          << Eam1104I >< MboII>< BbsI
GAATTTGGTG CCTCAGCTGA AACAGTTCGA GTTGAGGAAG AAGAAGAGGA AGACTGGCTG GATGATACTA
    3160          3170          3180          3190          3200          3210          3220

                                << Tru9I
    << FokI          << MseI          << Eco57I
    << DdeI          << BsrI>< MboII BsrI >>
CTGAGCAATC AGAGATTGAG CCAGAACCAG AACCTACACC TGAAGAACCA GTTAATCAGT TTAGTGGTTA
    3230          3240          3250          3260          3270          3280          3290

    << Tru9I          << MnlI
    << MseI          << Tru9I >< HindII>< Tru9I          << DraIII
    << DraI          << MseI          << HincII>< MseI          << BspWI
TTTAAAACTT ACTGACAATG TTGCCATTAA ATGTGTTGAC ATCGTTAAGG AGGCACAAAG TGCTAATCCT
    3300          3310          3320          3330          3340          3350          3360

                                << VneI
                                << SnoI
                                > < SduI
                                > < NspII
                                > < HgiAI
                                > < Bsp1286I
                                > < BmyI
                                << ApaLI
                                << Alw44I
    << BbvI          << HphI          > < NlaIII          << BspMI          > < Alw21I
ATGGTGATTG TAAATGCTGC TAACATACAC CTGAAACATG GTGGTGGTGT AGCAGGTGCA CTCAACAAGG
    3370          3380          3390          3400          3410          3420          3430

                                << Sau96I
                                << Pali
    << NlaIV          << NspIV
                                << HaeIII
                                << Cfr13I

```

FIGURE 13.9

EP 1 694 829 B1

```

    >< Eco64I
    >< BscBI
    >< BanI
    >< AccB1I>< NlaIII
CAACCAATGG TGCCATGCAA AAGGAGAGTG ATGATTACAT TAAGCTAAAT GGCCCTCTTA CAGTAGGAGG
    3440          3450          3460          3470          3480          3490          3500

    >< BsuRI
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< AluI
    >< AsuI
    >< MnlI
    >< SinI
    >< Sau96I
    >< NspIV
    >< NspHI>< NspHII
    >< Eco47I
    >< Cfr13I
    >< NlaIII
    >< BspMI
    >< BsiZI
    >< Bme18I
    >< AvaII MnlI ><
    >< DdeI
    >< NspI>< AsuI FokI ><
GTCTTGTTTG CTTTCTGGAC ATAATCTTGC TAAGAAGTGT CTGCATGTTG TTGGACCTAA CCTAAATGCA
    3510          3520          3530          3540          3550          3560          3570

    >< Tru9I
    >< HphI> < MseI
    >< Esp4I
    >< AluI
    >< NdeI
    >< AflIII>< Fnu4HI
    >< BbvI
GGTGAGGACA TCCAGCTTCT TAAGGCAGCA TATGAAAATT TCAATTCACA GGACATCTTA CTTGCACCAT
    3580          3590          3600          3610          3620          3630          3640

    RsaI ><
    Csp6I ><
    AfaI ><
    >< Eco57I
    >< BcgI
TGTTGTCAGC AGGCATATTT GGTGCTAAAC CACTTCAGTC TTTACAAGTG TCGGTGCAGA CGGTTCGTAC
    3650          3660          3670          3680          3690          3700          3710

    >< BsgI
    >< BspMI
    >< BcgI/a
    >< AluI
    >< NlaIII
ACAGGTTTAT ATTGCAGTCA ATGACAAAGC TCTTTATGAG CAGGTTGTCA TGGATTATCT TGATAACCTG
    3720          3730          3740          3750          3760          3770          3780

    >< MnlI
    >< RmaI
    >< MaeI
    >< MnlI
    >< Eco57I
    >< BscBI
    >< NlaIV
    >< TfiI
    >< MboII
    >< HinfI
    >< DdeI
AAGCCTAGAG TGGAAGCACC TAAACAAGAG GAGCCACCAA ACACAGAAGA TTCCAAAAC T GAGGAGAAAT
    3790          3800          3810          3820          3830          3840          3850

    >< Tru9I
    >< StuI
    >< Pali
    >< MseI
    >< MnlI
    >< MaeIII
    >< HaeIII
    >< EcoO651
    >< Eco147I
    >< Eco91I
    >< BsuRI
    >< BstXI ><
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
    >< TthHB8I
    >< TaqI
    >< BshI
    >< BstPI
    >< AatI
    >< BstEII
CTGTGCTACA GAAGCCTGTC GATGTGAAGC CAAAAATTAA GGCCTGCATT GATGAGGTTA CCACAACACT
    3860          3870          3880          3890          3900          3910          3920

    TfiI ><
    NlaIII ><
    HinfI ><
    >< DdeI
    >< EcoRV
    >< HindIII

```

FIGURE 13.10

EP 1 694 829 B1

```

                >> AsnI           >> EcoT22I           >> BspWI
                >> AseI           >> AvaIII           >> BglI           >> MaeII
AGAGACAAGA AAATTAATGC CTATATGCAT GGATGTTAGA GCCATAATGG CAACCATCCA ACGTAAGTAT
 4350         4360         4370         4380         4390         4400         4410

                >> SfaNI
>> Tru9I      > < HindII      >> TfiI           >> SpeI
>< MseI      > < HincII>< MboII      >> RmaI
                >> MnlI           >> DrdI >> HinfI      >> MaeI
AAAGGAATTA AAATTCAAGA GGGCATCGTT GACTATGGTG TCCGATTCTT CTTTATACT AGTAAAGAGC
 4420         4430         4440         4450         4460         4470         4480

                >> MaeIII
>> SfcI      >> Fnu4HI      >> MunI
                >> AluI           >> AciI           MaeIII ><
CTGTAGCTTC TATTATTACG AAGCTGAACT CTCTAAATGA GCCGCTTGTC ACAATGCCAA TTGTTATGT
 4490         4500         4510         4520         4530         4540         4550

                >> ThaI
                >> MvnI
                >> MboII
                >> HinPII
                >< HinPII
                >> Hin6I
                >< Hin6I
                >> HhaI
                >> HhaI
                >> Tru9I
>> NlaIII      >> Fnu4HI
                >> MseI           >> CfoI
                >> MnlI           >> CfoI
                >> Ksp632I      >> BstUI
                >> EarI           >> BssHII>< BspWI      >> Tru9I
                >> Eam1104I      >> Bsp50I           >> MseI
                >> BbvI           >> AccII           >> AluI           HphI ><
GACACATGGT TTTAATCTTG AAGAGGCTGC GCGCTGTATG CGTTCTCTTA AAGCTCCTGC CGTAGTGTCA
 4560         4570         4580         4590         4600         4610         4620

                >> MaeIII
>> SfaNI      >> AlwNI           >> MnlI >< MnlI>< DdeI
GTATCATCAC CAGATGCTGT TACTACATAT AATGGATACC TCACTTCGTC ATCAAAGACA TCTGAGGAGC
 4630         4640         4650         4660         4670         4680         4690

                >> SinI
                >> Sau96I
                >> NspIV
                >< NspHII
>> SduI      >> Eco47I
>> NspII     >> Cfr13I
>> HgiAI     >> BsiZI
>> Bsp1286I  >> Bme18I           >> RsaI
>> BmyI      >> AvaII           >> Csp6I
>> Alw21I    >> AsuI           >> AfaI
ACTTTGTAGA AACAGTTTCT TTGGCTGGCT CTTACAGAGA TTGGTCCTAT TCAGGACAGC GTACAGAGTT
 4700         4710         4720         4730         4740         4750         4760

                > < TthHB8I
                > < TaqI
                >< SduI
                >< NspII
                >< Van91I >< NspII
                >> Tru9I      >> RsaI >> PflMI >> Eco24I
                >> MseI      >> HphI >> BslI >> Bsp1286I
                >> Esp4I      >> Csp6I >> BsiYI >> BmyI GsuI ><

```

FIGURE 13.12

EP 1 694 829 B1

```

    >< AflIII >< MaeIII      >< AfaI >< AccB7I >< BanIIBpmI ><
AGGTGTTGAA TTTCTTAAGC GTGGTGACAA AATTGTGTAC CACACTCTGG AGAGCCCCGT CGAGTTTCAT
    4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830

                                >< Tru9I
                                >< PleI >< EcoNI
                                >< MnlI >< BslI
                                >< BsmAI >< BsiYI
>< MnlI      >< HphI      >< HinfI>< Alw26I>< AciI >< MseI
CTTGACGGTG AGGTTCTTTC ACTTGACAAA CTAAAGAGTC TCTTATCCCT GCGGGAGGTT AAGACTATAA
    4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900

                                >< AluI      >< NdeI
AAGTGTTCAC AACTGTGGAC AACACTAATC TCCACACACA GCTTGTGGAT ATGTCTATGA CATATGGACA
    4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970

    >< SinI
    >< Sau96I
    >< NspIV
    >< NspHII
    >< Eco47I
    >< Cfr13I
    >< BsiZI
    >< Bme18I
    >< AvaII
    >< AsuI
                                >< MaeIII >< Tru9I      >< MnlI
                                >< FokI >< MseI      >< BspHI
GCAGTTTGGT CCAACATACT TGGATGGTGC TGATGTTACA AAAATTA AAC CTCATGTAAA TCATGAGGGT
    4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
    >< RsaI
    >< RmaI
    >< MaeI
    >< Csp6I
    >< AfaI
                                >< SnaBI
                                >< MaeII >< HindIII >< RsaI
                                >< Eco105I >< Csp6I
                                >< BsaAI >< AluI >< AfaI
AAGACTTTCT TTGTACTACC TAGTGATGAC ACACTACGTA GTGAAGCTTT CGAGTACTAC CATACTCTTG
    5050      5060      5070      5080      5090      5100      5110

    >< RsaI
    >< NspI
    >< NspHI
    >< NlaIII
    >< Csp6I >< Tru9I
    >< AflIII >< MseI
    >< AfaI >< DraI
                                MnlI >
                                BslI ><
                                BsiYI ><
ATGAGAGTTT TCTTGGTAGG TACATGTCTG CTTTAAACCA CACAAAGAAA TGGAAATTTT CTCAAGTTGG
    5120      5130      5140      5150      5160      5170      5180

    >< Tru9I >< Tru9I
    >< MseI >< MseI
                                >< RmaI
                                >< MaeI
                                AluI >
TGGTTTAACT TCAATTA AAT GGGCTGATAA CAATTGTTAT TTGTCTAGTG TTTTATTAGC ACTTCAACAG
    5190      5200      5210      5220      5230      5240      5250

                                >< SfaNI
                                >< SduI
                                >< NspII
                                >< Eco24I
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI >< HphI >
                                >< BbvI Fnu4HI ><
                                >< BanII >< BspWI
    >< MnlI

```

FIGURE 13.13

EP 1 694 829 B1

```

CTTGAAGTCA AATTCAATGC ACCAGCACTT CAAGAGGCTT ATTATAGAGC CCGTGCTGGT GATGCTGCTA
 5260          5270          5280          5290          5300          5310          5320

  << VneI
  << SnaI
    << SduI
    << NspII
    << HgiAI
    << Bsp1286I
    << BmyI
  << ApaLI
  << Alw44I
    << Alw21I
    << AluI
    MboII <<
    << HphI
ACTTTTGTGC ACTCATACTC GCTTACAGTA ATAAACTGT TGGCGAGCTT GGTGATGTCA GAGAAACTAT
 5330          5340          5350          5360          5370          5380          5390

    < < SphI
    < < PaeI
    < < NspI
    < < NspHI << TfiI
    << SfcI < < NlaIII>< HinfI
    << Tru9I
    << MseI
GACCCATCTT CTACAGCATG CTAATTTGGA ATCTGCAAAG CGAGTTCTTA ATGTGGTGTG TAAACATTGT
 5400          5410          5420          5430          5440          5450          5460

    << Tru9I
    << MseI
    << AluI
    << RsaI
    < < Csp6I
    Esp4I >
    << AfaI
    AflII >
GGTCAGAAAA CTACTACCTT AACGGGTGTA GAAGCTGTGA TGTATATGGG TACTCTATCT TATGATAATC
 5470          5480          5490          5500          5510          5520          5530

    << RsaI
    << MboII
    << RmaIHinfI <<
    << Csp6I
    << MaeI << BbsI
    << Tru9I
    << MseI
    << SfaNI
    << NlaIII
    << AfaI
TTAAGACAGG TGTTTCCATT CCATGTGTGT GTGGTCGTGA TGCTACACAA TATCTAGTAC AACAAGAGTC
 5540          5550          5560          5570          5580          5590          5600

    << RsaI
    << PleI
    << BsgI
    < < DdeI
    << Csp6I
    << BspWI << BspMI
    << AfaI
TTCTTTTGTG ATGATGTCTG CACCACCTGC TGAGTATAAA TTACAGCAAG GTACATTCTT ATGTGCCAAT
 5610          5620          5630          5640          5650          5660          5670

    << RsaI
    << Eco31I
    << DdeI
    <> < MaeIII
    << BsmAI
    << Csp6I
    << BsaI
    MnlI <<
    << AfaI << BsrI
    << Alw26I
    HphI >
GAGTACACTG GTAACATCA GTGTGGTCAT TACACTCATA TAACTGCTAA GGAGACCCTC TATCGTATTG
 5680          5690          5700          5710          5720          5730          5740

    << SstI
    << SduI
    << SacI
    << NspII
    << HgiAI
    << Eco24I
    << Ecl136II
    << Bsp1286I
    << BmyI

    << SinI
    << Sau96I
    << NspIV
    << NspHII
    <> < RsaI
    <> < MaeIII
    << Eco47I
    << Cfr13I
    << BsiZI
    << Bmel8I

```

FIGURE 13. 14

EP 1 694 829 B1

```

    << BanII
    << Alw21I
    << AluI
ACGGAGCTCA CCTTACAAAG ATGTCAGAGT ACAAAGGACC AGTGACTGAT GTTTCTACA AGGAAACATC
    5750      5760      5770      5780      5790      5800      5810

    << AvaII
    << Csp6I>< AsuI
    > < AfaI >< BsrI>< AlwNI
    << TthHB8I
    << TaqI >< MaeIII
TTACTACTACA ACCATCAAGC CTGTGTCGTA TAAACTCGAT GGAGTTACTT ACACAGAGAT TGAACCAAAA
    5820      5830      5840      5850      5860      5870      5880

    << RsaI
    << Csp6I
    << SfcI >< BbvI
    << FokI
    << Fnu4HI
    << AfaI
TTGGATGGGT ATTATAAAA GGATAATGCT TACTATACAG AGCAGCCTAT AGACCTTGTA CCAACTCAAC
    5890      5900      5910      5920      5930      5940      5950

    Tru9I <<
    SwaI <<
    MseI <<
    > < NspI
    > < NspHI
    > < NlaIII
    << AflIII
    Tru9I <<
    SwaI <<
    MseI <<
    MamI <<
    DraI <<
    BsiBI <<
    BsaBI <<
CATTACCAA TGCGAGTTT GATAATTTCA AACTCACATG TTCTAACACA AAATTTGCTG ATGATTTAAA
    5960      5970      5980      5990      6000      6010      6020

    << MboII
    << AluI << AluI>< MaeIII
TCAAATGACA GGCTTCACAA AGCCAGCTTC ACGAGAGCTA TCTGTCACAT TCTTCCCAGA CTTGAATGGC
    6030      6040      6050      6060      6070      6080      6090

    << SfcI
GATGTAGTGG CTATTGACTA TAGACACTAT TCAGCGAGTT TCAAGAAAGG TGCTAAATTA CTGCATAAGC
    6100      6110      6120      6130      6140      6150      6160

    << Tru9I
    << ScrFI
    << MvaI
    << MseI
    << EcoRII
    << Ecl136I
    << DsaV
    << BstOI
    << BstNI
    << BsiLI
    << MunI
    << BstXI
    << ApyI
    << MaeII ><
    << DraIII
    << BstXI
CAATTGTTTG GCACATTAAC CAGGCTACAA CCAAGACAAC GTTCAAACCA AACACTTGGT GTTTACGTTG
    6170      6180      6190      6200      6210      6220      6230

    > < RsaI
    << Csp6I
    > < AfaI>< BsrI
    << MboII <<
    << BbsI
TCTTTGGAGT ACAAAGCCAG TAGATACTTC AAATTCATTT GAAGTTCTGG CAGTAGAAGA CACACAAGGA
    6240      6250      6260      6270      6280      6290      6300

    << HindII
    << HincII
    << MnlI
    << MboII
    << Eco57I
ATGGACAATC TTGCTTGGA AAGTCAACAA CCCACCTCTG AAGAAGTAGT GGAAAATCCT ACCATACAGA
    6310      6320      6330      6340      6350      6360      6370

```

FIGURE 13.15

EP 1 694 829 B1

```

                >< MaeIII
                >< MaeII
AGGAAGTCAT AGAGTGTGAC GTGAAAAC TA CCGAAGTTGT AGGCAATGTC ATACTTAAAC CATCAGATGA
6380          6390          6400          6410          6420          6430          6440

                >< XhoII
                >< Sau3AI
                >< NlaIII
                >< NdeII
                >< MflI
                >< MboI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BstYI
                >< BspAI
                >< Tru9I
                >< MseI
                >< BspHI >< Bsp143I>< Fnu4HI
                >< MaeIII >< MnlI >< BbvI >< AlwI
AGGTGTTAAA GTAACACAAG AGTTAGGTCA TGAGGATCTT ATGGCTGCTT ATGTGGAAAA CACAAGCATT
6450          6460          6470          6480          6490          6500          6510

                >< SauI
                >< RmaI
                >< MstII
                >< MaeI
                >< Eco81I
                >< DdeI
                >< CvnI
                >< Bsu36I
                >< Bse21I
                >< BfrI> < Tru9I
                >< AxyI> < MseI>< MunI
                >< Tru9I
                >< MseI
                >< AluI
                >< AocI >< DraI >< BbvI Fnu4HI ><
                >< NlaIII
ACCATTAAGA AACCTAATGA GCTTTCAC TA GCCTTAGGTT TAAAAACAAT TGCCACTCAT GGTATTGCTG
6520          6530          6540          6550          6560          6570          6580

                >< VspI >< StyI
                >< Tru9I >< EcoT14I >< DdeI
                >< MseI >< Eco130I >< BslI
                >< AsnI >< BssT1I >< BsiYI
                >< AseI >< BsaJI >< BfrI >< Fnu4HI
CAATTAATAG TGTTCCTTGG AGTAAAATTT TGGCTTATGT CAAACCATTC TTAGGACAAG CAGCAATTAC
6590          6600          6610          6620          6630          6640          6650

                >< HinPII
                >< Hin6I
                >< HhaI >< MaeII>< MseI
                >< DdeI >< DraIII
                >< BbvI >< CfoI >< AflIII
AACATCAAAT TGC GCTAAGA GATTAGCACA ACGTGTGTTT AACAATTATA TGCCTTATGT GTTTACATTA
6660          6670          6680          6690          6700          6710          6720

                >< RsaI >< RsaI>< XbaI
                >< Csp6I >< Csp6I >< RmaI
                >< MunI >< AfaI >< AfaI >< MaeI >< AluI
TTGTTCCAAT TGTGTACTTT TACTAAAAGT ACCAATTCTA GAATTAGAGC TTCACTACCT ACAACTATTG
6730          6740          6750          6760          6770          6780          6790

                >< VspI
                >< Tru9I
                >< NaeI
                >< MspI
                >< MseI

```

FIGURE 13. 16

EP 1 694 829 B1

```

                >> HpaII
                >> HapII
                >> Cfr10I >> FokI
                >> AsnI
                >> AseI>> HphI>> MaeIII
    >> Tru9I
    >> MseI
    << SfaNI
CTAAAAATAG TGTTAAGAGT GTTGCTAAAT TATGTTTGGA TGCCGGCATT AATTATGTGA AGTCACCCAA
    6800          6810          6820          6830          6840          6850          6860

                >> Tru9I    >> DdeI    MaeIII >
                >> MseI    >> BfrI    >> BbvI
ATTTTCTAAA TTGTTACAAA TCGCTATGTG GCTATTGTTG TTAAGTATTT GCTTAGGTTT TCTAATCTGT
    6870          6880          6890          6900          6910          6920          6930

                >> SduI
                >> NspII
                >> HgiAI
                >> Bsp1286I
                >> BmyI
                >> Alw21I
    > < RsaI
    >> Csp6I
    >> Fnu4HI    > < AfaI
GTAAGTCTG CTTTGGTGT ACTCTTATCT AATTTGGTG CTCCTTCTTA TTGTAATGGC GTTAGAGAAT
    6940          6950          6960          6970          6980          6990          7000

                Tru9I >>
                MseI >>
                >> Fnu4HI
    >> Tru9I    > < MaeIII
    >> MseI    >> MaeII
    TGTATCTTAA TTCGTCTAAC GTTACTACTA TGGATTTCTG TGAAGGTTCT TTTCTTGCA GCATTTGTTT
    7010          7020          7030          7040          7050          7060          7070

                > < TfiI
                >> MamI
                > < HinfI
                >> BsiBI
                >> XmnI>> MaeIII
    >> PleI>> HinfI    >> BsaBI >> AluI    >> Asp700I
    AAGTGGATTA GACTCCCTTG ATTCTTATCC AGCTCTTGAA ACCATTCAGG TGACGATTC ATCGTACAAG
    7080          7090          7100          7110          7120          7130          7140

                >> Pali
                >> NspBII
                >> HaeIII
                >> GdiII
                >> Fnu4HI
                >> EaeI
                >> DdeI
                >> BsuRI
    >> RmaI
    >> MaeI
    >> BshI >> BslI
    >> AciI>> BsiYI
CTAGACTTGA CAATTTTAGG TCTGGCCGCT GAGTGGGTTT TGGCATATAT GTTGTTTACA AAATTCTTTT
    7150          7160          7170          7180          7190          7200          7210

                >> BspMI
                >> AluI
                >> RmaI
                >> MaeI
ATTTATTAGG TCTTTCAGCT ATAATGCAGG TGTTCTTTGG CTATTTTGCT AGTCATTCA TCAGCAATTC
    7220          7230          7240          7250          7260          7270          7280

                RsaI >>
                >> MboII
                >> NlaIV
                >> Eco64I
                > < RsaI >> BscBI
    >> Csp6I >> BanI
    > < NlaIII    > < AfaI>> AccB1I
                BsiBI >>
                BsaBI >>
                AfaI >>

```

FIGURE 13.17

EP 1 694 829 B1

```

TTGGCTCATG TGGTTTATCA TTAGTATTGT ACAAATGGCA CCCGTTTCTG CAATGGTTAG GATGTACATC
  7290      7300      7310      7320      7330      7340      7350

TthHB8I >>
>> TaqI
MnlI >>
>> NdeI Ksp632I >>
>> Ksp632I >> FokI
>> EarI >> MboII EarI >>
>> FokI >> Eam1104I >> AluI >> MboII >> NlaIII Eam1104I >>
TTCTTTGCTT CTTTCTACTA CATATGGAAG AGCTATGTTT ATATCATGGA TGGTTGCACC TCTTCGACTT
  7360      7370      7380      7390      7400      7410      7420

XhoII >>
Sau3AI >>
NlaIII >>
NdeII >>
MflI >>
MboI >>
>> ThaI >> Ksp632I
>> MvnI >> EarI
>> HinPII >> MluI >> Eam1104I
>> Hin6I >> BstUI DpnII >>
>> HhaI >> Bsp50I >> RsaI BstYI >>
>> NlaIII >> AflIII >> Csp6I >> Tru9I BspAI >>
>> BspWI >> BspWI >> AccII >> AfaI >> MseI BglII >>
GCATGATGTG CTATAAGCGC AATCGTGCCA CACGCGTTGA GTGTACAAC TTTGTTAATG GCATGAAGAG
  7430      7440      7450      7460      7470      7480      7490

>> Pali
>> HaeIII
>> DsaI >> MunI
>> MboII >> BsuRI MaeIII >>
>> DpnI >> BshI >> MunI BsmAI >>
>> Bsp143I >> MnlI >> BsaJI >> PleI >> HinfI Alw26I >>
ATCTTTCTAT GTCTATGCAA ATGGAGGCCG TGGCTTCTGC AAGACTCACA ATTGGAATTG TCTCAATTGT
  7500      7510      7520      7530      7540      7550      7560

>> RsaI Tru9I >>
>> Csp6I MseI >>
>> BsrI >> GsuI >> MaeIIIDraI >>
>> AfaI >> BpmI >> BsrI
GACACATTTT GCACTGGTAG TACATTCATT AGTGATGAAG TTGCTCGTGA TTTGTCAC TCAGTTAAAA
  7570      7580      7590      7600      7610      7620      7630

>> ThaI
>> MvnI
>> HphI
HinPII >>
>> HinPII
>> Hin6I
>> Hin6I
HhaI >>
>> HhaI
CfoI >>
>> CfoI
>> BstUI
>> BssHII
Bsp50I >>
>> BsrI >> AccII
GACCAATCAA CCCTACTGAC CAGTCATCGT ATATTGTTGA TAGTGTTGCT GTGAAAAATG GCGCGTTCA
  7640      7650      7660      7670      7680      7690      7700

```

FIGURE 13. 18

EP 1 694 829 B1

```

                                >> FokI
                                >> BsmAI
                                >> MnlI
                                >> Alw26I
                                >> AciI
CCTCTACTTT GACAAGGCTG GCAAAAAGAC CTATGAGAGA CATCCGCTCT CCCATTTTGT CAATTTAGAC
 7710          7720          7730          7740          7750          7760          7770

                                >> VspI
                                >> Tru9I
                                >> MseI
                                >> AsnI
                                >> AseI
                                >< BcgI/a
> < AluI
AATTTGAGAG CTAACAACAC TAAAGGTTCA CTGCCTATTA ATGTCATAGT TTTTGATGGC AAGTCCAAAT
 7780          7790          7800          7810          7820          7830          7840

                                >> SfcI
                                >< PvuII
                                >> RsaI
                                >< Psp5I
                                >< PleI
                                >> Csp6I
                                >< NspBII
                                >< HinFI
                                >< DdeI
                                >< BcgI
                                >< AfaI
                                >< AluI
GCGACGAGTC TGCTTCTAAG TCTGCTTCTG TGTACTACAG TCAGCTGATG TGCCAACCTA TTCTGTTGCT
 7850          7860          7870          7880          7890          7900          7910

                                TthHB8I ><
                                TaqI ><
                                SalI ><
                                RtrI ><
                                HindII >
                                HincII >
                                >< ScaI
                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< Tru9I
                                >< SfaNI
                                >< Eco57I
                                >< MaeII
                                >< AfaI
                                >< MseI
                                >< AccI ><
>< AluI
TGACCAAGCT CTTGTATCAG ACGTTGGAGA TAGTACTGAA GTTCCGTTA AGATGTTTGA TGCTTATGTC
 7920          7930          7940          7950          7960          7970          7980

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< Esp4I
                                >< AflIII
                                >< SfcI
                                >< BspWI
                                >< AluI
GACACCTTTT CAGCAACTTT TAGTGTTTCCT ATGGAAAAAC TTAAGGCACT TGTGCTTACA GCTCACAGCG
 7990          8000          8010          8020          8030          8040          8050

                                >< PvuII
                                >< Psp5I
                                >< NspBII
                                >< Fnu4HI
                                >< AluI
                                >< BbvI
AGTTAGCAAA GGGTGTAGCT TTAGATGGTG TCCTTTCTAC ATTTCGTGTCA GCTGCCCGAC AAGGTGTTGT
 8060          8070          8080          8090          8100          8110          8120

                                MaeIII ><
                                >< HindII
                                >< BsmAI
                                >< DdeI
                                >< HincII
                                >> FokI
                                >< Alw26I
                                >< BfrI
TGATACCGAT GTTGACACAA AGGATGTTAT TGAATGTCTC AACTTTTCAC ATCACTCTGA CTTAGAAGTG
 8130          8140          8150          8160          8170          8180          8190

                                >< XhoII
                                Sau3AI ><
                                >< NdeII
                                >< MflI
                                >< MboI
                                >< NlaIII
                                >< HgaI
                                >< HinII
                                >< DpnII
                                DpnI ><

```

FIGURE 13.19

EP 1 694 829 B1

```

                                Bsp143I ><
                                >< BsaHI >< BstYI
                                >< BbiII >< BspAI
                                >< AcyI >< BglII
                                >< MaeIII>< HphI
                                >< MaeIII >< HphI >< NlaIII
ACAGGTGACA GTTGTAAACA TTTCATGCTC ACCTATAATA AGGTTGAAAA CATGACGCCC AGAGATCTTG
      8200          8210          8220          8230          8240          8250          8260

    >< NspI
    >< NspHI
    >< NlaIII
>< HinPII
>< Hin6I
  >< HhaI
  >< CfoI
                                >< BspWI >< MaeIII
GCGCATGTAT TGACTGTAAT GCAAGGCATA TCAATGCCCA AGTAGCAAAA AGTCACAATG TTTCACTCAT
      8270          8280          8290          8300          8310          8320          8330

                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< PvuII
                                >< Psp5I
                                >< Eam1105I
                                >< NspBII
                                >< BbvI
                                >< Fnu4HI
                                >< AflIII
                                >< AluI >< BbvI >< Fnu4HI
CTGGAATGTA AAAGACTACA TGTCTTTATC TGAACAGCTG CGTAAACAAA TTCGTAGTGC TGCCAAGAAG
      8340          8350          8360          8370          8380          8390          8400

                                >< RmaI
                                >< MaeI >< Eam1105I
                                >< MboII
AACACATAC CTTTTAGACT AACTTGTGCT ACAACTAGAC AGGTTGTCAA TGTCATAACT ACTAAAATCT
      8410          8420          8430          8440          8450          8460          8470

                                >< Tru9I
                                >< PstI
                                >< MseI
                                >< HaeIII
                                >< ScaI
                                >< Esp4I
                                >< RsaI >< Tru9I
                                >< Csp6I >< MseI
                                >< AfaI >< DraI >< AflIII >< BbvI
CACTCAAGGG TGGTAAGATT GTTAGTACTT GTTTTAAACT TATGCTTAAG GCCACATTAT TGTGCGTTCT
      8480          8490          8500          8510          8520          8530          8540

                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BsrI
                                >< AfaI
                                >< NlaIII
                                >< MaeIII
                                >< Fnu4HI
TGCTGCATTG GTTTGTTATA TCGTTATGCC AGTACATACA TTGTCAATCC ATGATGGTTA CACAAATGAA
      8550          8560          8570          8580          8590          8600          8610

                                >< MaeIII
                                >< MaeIII
                                >< MaeIII
                                >< FokI
ATCATTGGTT ACAAAGCCAT TCAGGATGGT GTCACCTCGTG ACATCATTC TACTGATGAT TGTTTTGCAA
      8620          8630          8640          8650          8660          8670          8680

                                SfcI >
                                Fnu4HI ><
                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< NlaIII
                                >< HgaI
                                >< BstXI
                                >< BbvI
                                >< AluI
ATAAACATGC TGGTTTTGAC GCATGGTTTA GCCAGCGTGG TGGTTCATAC AAAAATGACA AAAGCTGCCC
      8690          8700          8710          8720          8730          8740          8750

```

FIGURE 13. 20

EP 1 694 829 B1

```

                                >> ScrFI
                                >< MvaI >< MspI
                                >< EcoRII >< HpaII
                                >< Ecl136I>< NciI
                                >< DsaV >< HapII
                                >< BstOI>< DsaV
                                >< BstNI >< Csp6I
                                >< BsiLI >< BcnIDdeI ><
                                >< ApyI >< AfaI
                                >< Fnu4HI
                                >< AluI
TGTAGTAGCT GCTATCATT A CAAGAGAGAT TGGTTTCATA GTGCCTGGCT TACCGGGTAC TGTGCTGAGA
      8760      8770      8780      8790      8800      8810      8820

                                >< MaeIII >< HphI
                                >< MnlI >< BspWI
GCAATCAATG GTGACTTCTT GCATTTTCTA CCTCGTGT TTAGTGCTGT TGGCAACATT TGCTACACAC
      8830      8840      8850      8860      8870      8880      8890

                                Tru9I >
                                SfaNI ><
                                >< RsaI
                                MseI >
                                >< BspWI >< Fnu4HI >< Csp6I
                                >< BbvI>< MnlI >< DdeI >< AfaI
CTTCCAACT CATTGAGTAT AGTGATTTTG CTACCTCTGC TTGCGTTCTT GCTGCTGAGT GTACAATTTT
      8900      8910      8920      8930      8940      8950      8960

                                >< RmaI
                                >< MnlI
                                >< MaeI
TAAGGATGCT ATGGGCAAAC CTGTGCCATA TTGTTATGAC ACTAATTTGC TAGAGGGTTC TATTTCTTAT
      8970      8980      8990      9000      9010      9020      9030

                                ScrFI >
                                MvaI >
                                MnlI ><
                                EcoRII ><
                                Ecl136I >
                                DsaV ><
                                BstOI >
                                BstNI >
                                >< NlaIV >< FokI >< BsiLI >
                                >< AluI >< BscBI >< ApyI >
AGTGAGCTTC GTCCAGACAC TCGTTATGTG CTTATGGATG GTTCCATCAT ACAGTTTCTT AACACTTACC
      9040      9050      9060      9070      9080      9090      9100

                                >< RsaI
                                >< SfcI >< NspI
                                >< ScaI >< NspHI
                                >< SfaNI >< RsaI >< NlaIII
                                >< MaeIII >< Csp6I >< NlaIII
                                >< GsuI >< AfaI >< Csp6I
                                >< BpmI >>< DdeI >>< AccI >>< AfaI
TGGAGGGTTC TGTTAGAGTA GTAACAAC TTGATGCTGA GTACTGTAGA CATGGTACAT GCGAAAGGTC
      9110      9120      9130      9140      9150      9160      9170

                                >< SstI
                                >< SduI
                                >< SacI
                                NspII ><
                                HgiAI ><
                                Eco24I ><
                                Bsp1286I ><

```

FIGURE 13.21

EP 1 694 829 B1

```

Ecl136II >>> BmyI
BanII >>
>> Tru9I
Alw21I >>
>> BsrI
>> MseI
>> AluI
AGAAGTAGGT ATTTGCCTAT CTACCAGTGG TAGATGGGTT CTTAATAATG AGCATTACAG AGCTCTATCA
9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240

>> TfiI
>> SfaNI
>> HinfI
>> AluI
>> MnlI
GGAGTTTTCT GTGGTGTGA TGCGATGAAT CTCATAGCTA ACATCTTTAC TCCTCTTGTG CAACCTGTGG
9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310

>> MaeIII
HphI >>
>> Eco57I
>> BbvI Fnu4HI >>
GTGCTTTAGA TGTGTCTGCT TCAGTAGTGG CTGGTGGTAT TATTGCCATA TTGGTGACTT GTGCTGCCTA
9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380

>> RsaI
>> Csp6I >> NlaIII
>> MaeII
>> BbvI
>> Fnu4HI
>> AflIII
>> AfaI >> HphI
>> BspWI
CTACTTTATG AAATTCAGAC GTGTTTTTGG TGAGTACAAC CATGTTGTTG CTGCTAATGC ACTTTTGTTT
9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450

>> RsaI
>> NlaIV
>> KpnI
>> Eco64I
>> Csp6I
>> BscBI
>> Asp718
>> BanI >> AluI
>> AfaI
>> AccB1I
>> Acc65I
>> AluI >> DsaV >> AccI
>< ScrFI
>< NciI
>< MspI
>< HpaII
>< HinfI
>< HapII
>< BcnI >< DdeI
TTGATGTCTT TCACTATACT CTGTCTGGTA CCAGCTTACA GCTTTCTGCC GGGAGTCTAC TCAGTCTTTT
9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520

>> RsaI
>> Csp6I
>> AfaI >> HphI
>> HphI
NlaIII >>
ACTTGTACTT GACATTCTAT TTCACCAATG ATGTTTCATT CTTGGCTCAC CTTCAATGGT TTGCCATGTT
9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590

TTCTCCTATT GTGCCTTTTT GGATAACAGC AATCTATGTA TTCTGTATTT CTCTGAAGCA CTGCCATTGG
9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660

>> TthHB8I
>> RsaI
>> MnlI
>> MnlI
>> Tru9I
>> Csp6I
>> Tru9I
>> PleI
>> BcgI/a >> TaqI
>> MseI >> DdeI
>> NlaIII
>> BbvI
>> Eco57I >> BfrI >> HinfI >> MseI >> MaeIII
>> AfaI Fnu4HI >>
TTCTTTAACA ACTATCTTAG GAAAAGAGTC ATGTTTAATG GAGTTACATT TAGTACCTTC GAGGAGGCTG
9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730

>> RsaI
>> Csp6I
>> BcgI
>> RsaI
>> Csp6I
>> BsmAI

```

FIGURE 13.22

EP 1 694 829 B1

```

    >< AfaI          >< AfaI          >< Alw26I
CTTTGTGTAC CTTTTTGCTC AACAAGGAAA TGTACCTAAA ATTGCGTAGC GAGACACTGT TGCCACTTAC
    9740          9750          9760          9770          9780          9790          9800

                                >< NlaIV
                                >< DdeI
                                >< BscBI
                                >< BfrI    AluI ><
ACAGTATAAC AGGTATCTTG CTCTATATAA CAAGTACAAG TATTTTCAGTG GAGCCTTAGA TACTACCAGC
    9810          9820          9830          9840          9850          9860          9870

    >< Fnu4HI
    >< DdeI
    >< Fnu4HI    >< BfrI
    >< BbvI    >< AluI    >< BbvI
TATCGTGAAG CAGCTTGCTG CCACTTAGCA AAGGCTCTAA ATGACTTTAG CAACTCAGGT GCTGATGTTG
    9880          9890          9900          9910          9920          9930          9940

                                >< SfcI          >< BsmI
                                >< PstI          >< BscCI
TCTACCAACC ACCACAGACA TCAATCACTT CTGCTGTTCT GCAGAGTGGT TTTAGGAAAA TGGCATTTCC
    9950          9960          9970          9980          9990          10000          10010

    >< RsaI
    >< NlaIII
    >< MaeIII
    >< Csp6I          >< Tru9I
    >< AfaI          >< MseI
GTCAGCAAAA GTTGAAGGGT GCATGGTACA AGTAACCTGT GGAECTACAA CTCTTAATGG ATTGTGGTTG
    10020          10030          10040          10050          10060          10070          10080

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                >< Tru9I    NdeII ><
                                >< NspI      MflI ><
                                >< NspHI     MboI ><
                                >< NlaIII    DpnII ><
                                >< MseI      BstYI ><
                                >< MboII    BspAI ><
                                >< BbsI      BglII ><
GATGACACAG TATACTGTCC AAGACATGTC ATTTGCACAG CAGAAGACAT GCTTAATCCT AACTATGAAG
    10090          10100          10110          10120          10130          10140          10150

                                Pali >
                                MscI >
                                HaeIII >
                                EaeI ><
                                BsuRI >
                                BshI >
                                BclI >
>< DpnI >< MboII
>< Bsp143I
ATCTGCTCAT TCGCAAATCC AACCATAGCT TTCTTGTTCA GGCTGGCAAT GTTCAACTTC GTGTTATTGG
    10160          10170          10180          10190          10200          10210          10220

                                >< DdeI> < Tru9I
                                >< BfrI> < MseI          >< DdeI
CCATTCTATG CAAAATTGTC TGCTTAGGCT TAAAGTTGAT ACTTCTAACC CTAAGACACC CAAGTATAAA
    10230          10240          10250          10260          10270          10280          10290

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
                                >< SphI

```

FIGURE 13.23

EP 1 694 829 B1

```

                >> DsaV
                >> BstOI
                >> BstNI
                >> BsiLI
                >> ApyI
    TTTGTCCGTA TCCAACCTGG TCAAACATTT TCAGTTCTAG CATGCTACAA TGGTTCACCA TCTGGTGTTT
    10300      10310      10320      10330      10340      10350      10360

                >> PaeI
                >> NspI
                >> NspHI
                >> RmaI >> NlaIII
                >> MaeI >> HphI

                >> Sau3AI
                >> NdeII
                >> MboI>> NlaIII
                >> DpnII

    >> Eco31I
    >> BsmAI
    >> BsaI>> NlaIII
    >> Alw26I
    ATCAGTGTGC CATGAGACCT AATCATACCA TTAAAGGTTT TTCCTTAAT GGATCATGTG GTAGTGTGG
    10370      10380      10390      10400      10410      10420      10430

                >> Tru9I
                >> MseI
                >> Tru9I>> DpnI
                >> MseI >> Bsp143I
                >> BspAI>> AlwI

                >> Zsp2I
    >> Ppu10I
                >> NsiI>> SfaNI
                >> NdeI
                >> Mph1103I
                >> EcoT22I
    >> Tru9I
    >> MseI
    TTTTAACATT GATTATGATT GCGTGTCTTT CTGCTATATG CATCATATGG AGCTTCCAAC AGGAGTACAC
    10440      10450      10460      10470      10480      10490      10500

                >> RsaI >>
                >> Csp6I >>
                > < AvaIII >> AluI >> AfaI >>

                >> SinI
                >> Sau96I
                >> NspIV
                >> NspHII
                >> Eco47I
                >> Cfr13I
                >> BsiZI
                >> Bme18I >> HindII
                >> AvaII >> HincII
                >> AsuI>> BsgI >> BbvI >> BspMI AfaI >>
    GCTGGTACTG ACTTAGAAGG TAAATTCTAT GGTCCATTTG TTGACAGACA AACTGCACAG GCTGCAGGTA
    10510      10520      10530      10540      10550      10560      10570

                >> SfcI
                >> RsaI >>
                >> PstI >>
                >> Fnu4HI
                >> Csp6I >>
                >> BspWI

                >> Tru9I
                >> MseI
                >> AfaI>> BfrI
                >> Tru9I
                >> NlaIII
                >> BbvI
                >> Fnu4HI
                >> HphI >>
    CAGACACAAC CATAACATTA AATGTTTTGG CATGGCTGTA TGCTGCTGTT ATCAATGGTG ATAGGTGGTT
    10580      10590      10600      10610      10620      10630      10640

    >> Tru9I
    >> TfiI
    >> MseI
    >> HphI
    >> HinFI
    TCTTAATAGA TTCACCACTA CTTTGAATGA CTTTAACCTT GTGGCAATGA AGTACAAC TAACCTTTG
    10650      10660      10670      10680      10690      10700      10710

                >> RsaI
                >> Csp6I
                >> AfaI

                >> SinI
                >> Sau96I
                >> PssI
                >> Psp5II
                >> PpuMI
                >> NspIV
                >> NspHII
                >> NlaIV

```

FIGURE 13. 24

EP 1 694 829 B1

```

                >> EcoO109I
                >> Eco47I
    << Sau3AI      >> DraII
    << NdeII       >> Cfr13I
    << MboI        >> Bsi2I
    << DpnII>> NlaIII >> BscBI
    >> DpnI >> HindII >> Bme18I
    << BspAI >> HincII >> AvaII
    >> Bsp143I >> AsuI >> MnlI >> BbvI
ACACAAGATC ATGTTGACAT ATTGGGACCT CTTTCTGCTC AACAGGAAT TGCCGTCTTA GATATGTGTG
    10720      10730      10740      10750      10760      10770      10780

                >> StyI
                >> RsaI
                >> EcoT14I
                >> Eco130I
    >> SfcI
    >< Csp6I
    << Fnu4HI      >> Fnu4HI
    >> BbvI       >> Fnu4HI
    >> BbvI       >> AluI >> PstI
    >> BbvI       >> AfaI
CTGCTTTGAA AGAGCTGCTG CAGAATGGTA TGAATGGTCG TACTATCCTT GGTAGCACTA TTTTAGAAGA
    10790      10800      10810      10820      10830      10840      10850

                >> StyI
                >> EcoT14I
                >> Eco130I
                >> BssT1I
    >< MaeIII>< BsaJI
    << MboII
TGAGTTTACA CCATTTGATG TTGTTAGACA ATGCTCTGGT GTTACCTTCC AAGGTAAGTT CAAGAAAATT
    10860      10870      10880      10890      10900      10910      10920

    >> SfaNI
    >< SduI
    >< NspII >> Tru9I
    << Tru9I>< Bsp1286I >> MseI
    << MseI >< BmyI >> FokI
    << MseI >< BmyI >> FokI
GTTAAGGGCA CTCATCATTG GATGCTTTTA ACTTTCTTGA CATCACTATT GATTCTTGTT CAAAGTACAC
    10930      10940      10950      10960      10970      10980      10990

                >> XmnI
                >> BsmI
                >> BscCI
                >> Asp700I
    << MaeIII
    >> BbvI >> BbvI
AGTGGTCACT GTTTTCTTTT GTTTACGAGA ATGCTTTCTT GCCATTTACT CTTGGTATTA TGGCAATTGC
    11000      11010      11020      11030      11040      11050      11060

    << NspI
    << NspHI >> Tru9I
    << NlaIII >> MseI >> BsmI
    << BspWI >> Fnu4HI>< BspWI >> BscCI >> MaeIII
TGCAATGTGCT ATGCTGCTTG TTAAGCATAA GCACGCATTC TTGTGCTTGT TTCTGTACC TTCTCTTGCA
    11070      11080      11090      11100      11110      11120      11130

                >> SfaNI
                >> RmaI
    >< NspI
    >< NlaIII
    >> NheI
    >> Tru9I >> MaeI >> BsiBI >> NlaIII
    << BspWI >> MseI >> AccI>< NspHI>< AluI >> BsaBI >> NlaIII
ACAGTTGCTT ACTTTAATAT GGTCTACATG CCTGCTAGCT GGGTGATGCG TATCATGACA TGGCTTGAAT
    11140      11150      11160      11170      11180      11190      11200

```

FIGURE 13.25

EP 1 694 829 B1

```

                >< DrdI >< Alw26I
GTGTTTATGA C TACTTGGTC TCTACACAAG AATTTAGGTA TATGAACTCC CAGGGGCTTT TGCCTCCTAA
    11630      11640      11650      11660      11670      11680      11690

                >< ApyI      DdeI ><
                >< Tru9I
                >< MseI
>< SfaNI      > < HindIII> < Tru9I
    >< MnlI      >< AluI > < MseI > < MnlI      > < NlaIII
GAGTAGTATT GATGCTTTCA AGCTTAACAT TAAGTTGTTG GGTATTGGAG GTAAACCATG TATCAAGGTT
    11700      11710      11720      11730      11740      11750      11760

                >< VneI
                >< SnoI
                    >< SduI
                    >< NspII
                    >< HgiAI
                    >< Bsp1286I
                    >< BmyI >< RsaI
                >< RsaI      >< ApaLI      >< MboII
                >< Csp6I      >< Alw44I      >< Csp6I      DdeI >
                >< AfaI      >< MaeII >< Alw21I >< AfaI      BfrI >
GCTACTGTAC AGTCTAAAT GTCTGACGTA AAGTGCACAT CTGTGGTACT GCTCTCGGTT CTTCAACAAC
    11770      11780      11790      11800      11810      11820      11830

                >< NspII> < RsaI
                >< DraIII
                >< SduI>< Csp6I
                >< Bsp1286I
                >< MboII      >< HinfI >< PleI      >< BmyI > < AfaI      >< MboII
TTAGAGTAGA GTCATCTTCT AAATTGTGGG CACAATGTGT ACAACTCCAC AATGATATTC TTCTTGCAAA
    11840      11850      11860      11870      11880      11890      11900

                >< TthHB8I
                >< TaqI
                >< HindIII      >< MboII      SfcI ><
                >< AluI      > < Eco57I      >< NlaIII
AGACACAACT GAAGCTTTTCG AGAAGATGGT TTCTCTTTTG TCTGTTTTGC TATCCATGCA GGGTCTGTGA
    11910      11920      11930      11940      11950      11960      11970

                >< VspI
                >< Tru9I      > < Ksp632I
                >< MseI      >< TthHB8I      > < EarI
                >< AsnI      >< TaqI >< MboII      > < Eam1104I
                >< AseI>< MnlI >< BcgI/a >< Eco57I >< Eco57I >< BcgI
GACATTAATA GGTGTGCGA GGAAATGCTC GATAACCGTG CTACTCTTCA GGCTATTGCT TCAGAATTTA
    11980      11990      12000      12010      12020      12030      12040

                >< StuI
                >< ScrFI
                >< Pali
                >< MvaI>< HaeIII
                >< EcoRII>< Eco147I
                >< Ecl136I
                >< DsaV >< BsuRI
                >< BstOI
                >< BstNI
                >< BspWI
                >< BsiLI
                >< Fnu4HI      >< BsaJI >< BshI      TfiI ><
                >< NdeI      >< BspWI>< MnlI >< BglI      >< SfcI HinfI ><
                >< AciI      >< ApyI>< AatI      > < AluI

```

FIGURE 13. 27

EP 1 694 829 B1

```

GTTCTTTACC ATCATATGCC GCTTATGCCA CTGCCCAGGA GGCCTATGAG CAGGCTGTAG CTAATGGTGA
12050      12060      12070      12080      12090      12100      12110

    >> XmnI          >> Tru9I          >> SfaNI
    >< HphI          >< MseI          >< DdeI
    >< Asp700I      >< Eco57I      >< BbvI Fnu4HI ><
TTCTGAAGTC GTTCTCAAAA AGTTAAAGAA ATCTTTGAAT GTGGCTAAAT CTGAGTTTGA CCGTGATGCT
12120      12130      12140      12150      12160      12170      12180

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                NdeII ><
                                MnlI >
                                >< MnlI
                                >< MflI
                                >< MboI
                                DpnII ><
                                DpnI ><
                                DdeI ><
                                BstYI ><
                                >< BspWI          >< RsaIBspAI ><
                                >< BspAI          >< Csp6IBsp143I ><
                                >< Bsp143I        >< AfaIBglII ><
    >< NlaIII
GCCATGCAAC GCAAGTTGGA AAAGATGGCA GATCAGGCTA TGACCCAAAT GTACAAACAG GCAAGATCTG
12190      12200      12210      12220      12230      12240      12250

                                >< SpeI          >< Ksp632I > < HindIII
                                >< RmaI          >> DdeI >< SfaNI
                                >< MaeIII        >< MboII        >< Eam1104I >< BspWI
                                >< MaeI          >< BspWI        >< EarI>< BfrI >< AluI
AGGACAAGAG GGCAAAAGTA ACTAGTGCTA TGCAAACAAT GCTCTTCACT ATGCTTAGGA AGCTTGATAA
12260      12270      12280      12290      12300      12310      12320

                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< HinPII
                                >< Hin6I
                                >< HhaI
                                >< CfoI
                                >< BstUI
                                >< Tru9I        >< Bsp50I
                                >< MseI        >< AccII          SfcI ><
TGATGCACTT AACAAACATTA TCAACAATGC GCGTGATGGT TGTGTCCAC TCAACATCAT ACCATTGACT
12330      12340      12350      12360      12370      12380      12390

                                >< RsaI
                                >< NlaIV
                                >< Eco64I
                                >< Csp6I
                                >< BslI
                                >< BsiYI>< KpnI
                                >< BscBI
                                >< BanI
                                >< Asp718
                                >< AfaI
                                >< NlaIII
                                >< BstXI
                                >< AccB1I          >< MaeIII
    >< Fnu4HI >< BbvI          >< Acc65I          BsgI ><
ACAGCAGCCA AACTCATGGT TGTTGTCCCT GATTATGGTA CCTACAAGAA CACTTGTGAT GGTAACACCT
12400      12410      12420      12430      12440      12450      12460

    >< Zsp2I
    >< Ppu10I

```

FIGURE 13.28

EP 1 694 829 B1

```

    >< NsiI
    >< Mph1103I
    >< NdeI>< EcoT22I
    >< AvaIII >< SfaNI
    >< SfaNI
    >< AciI
    DdeI ><
    BfrI ><
TTACATATGC ATCTGCACTC TGGGAAATCC AGCAAGTTGT TGATGCGGAT AGCAAGATTG TTCAACTTAG
    12470      12480      12490      12500      12510      12520      12530

    >< PalI
    >< HaeIII >< MnlI >< DdeIDdeI ><
    >< Tru9I>< NlaIII
    >< BsuRI >< MaeIII >< BspWI
    >< MseI>< HphI >< XcmI>< BshI >< AluI BspWI ><
TGAAATTAAC ATGGACAATT CACCAAATTT GGCTTGGCCT CTTATTGTTA CAGCTCTAAG AGCCAACTCA
    12540      12550      12560      12570      12580      12590      12600

    RsaI ><
    NlaIV ><
    KpnI ><
    >< Fnu4HI
    Eco64I ><
    Csp6I ><
    BscBI ><
    Asp718 ><
    AfaI ><
    >< AciI>< BanI
    AccBI ><
    >< AluI >< SfcI >< DdeI>< BsrI >< PshAI Acc65I ><
GCTGTAAAC TACAGAATAA TGAAGTACTG CAGTAGCAC TACGACAGAT GTCCTGTGCG GCTGGTACCA
    12610      12620      12630      12640      12650      12660      12670

    >< TthHB8I
    >< TaqI
    >< SfuI
    >< NspV
    >< MnlI
    >< LspI
    >< Csp45I
    >< BstBI
    >< Bsp119I
    >< BsiCI
    >< Bpu14I
    >< AsuII
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AluI
    >< AfaI
CACAAACAGC TTGTACTGAT GACAATGCAC TTGCCTACTA TAACAATTCG AAGGGAGGTA GGTTTGTGCT
    12680      12690      12700      12710      12720      12730      12740

    >< XhoII
    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MflI
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< BstYI >< TfiI >< RsaI
    >< BspAI >< RmaI >> Csp6I
    >< Bsp143I >< HinfI >< Csp6I>< RsaI
    >< BglII >< MaeI >< DdeI >> AfaI>< AfaI
GGCATTACTA TCAGACCACC AAGATCTCAA ATGGGCTAGA TTCCCTAAGA GTGATGGTAC AGGTACAATT
    12750      12760      12770      12780      12790      12800      12810

    >< Sau96I
    >< PssI
    >< PalI
    >< NspIV

```

FIGURE 13.29

EP 1 694 829 B1

```

                                >< HaeIII
                                >< EcoO109I
                                >< DraII
                                >< Cfr13I
                                >< BsuRI
                                >< BsiZI           RsaI >
                                >< BshI           Csp6I ><
                                >< AsuI           AfaI >
TACACAGAAC TGGAACCACC TTGTAGGTTT GTTACAGACA CACCAAAGG GCCTAAAGTG AAATACTTGT
12820      12830      12840      12850      12860      12870      12880

                                >< SfcI
                                > < MboII
                                MaeII ><
                                >< Fnu4HI >< RsaI
                                >< Eco57I >< Csp6I
                                > < BbsI
                                >< Tru9I
                                >< MseI >< MnlI
                                >< BbvI           >< AluI           >< AfaI
ACTTCATCAA AGGCTTAAAC AACCTAAATA GAGGTATGGT GCTGGGCAGT TTAGCTGCTA CAGTACGTCT
12890      12900      12910      12920      12930      12940      12950

                                >< RsaI
                                >< SfcI >< Csp6I
                                >< BspWI           >< AfaI           >< BspMI           AccI ><
TCAGGCTGGA AATGCTACAG AAGTACCTGC CAATTCAACT GTGCTTTCCT TCTGTGCTTT TGCAGTAGAC
12960      12970      12980      12990      13000      13010      13020

                                >< RmaI
                                >< MnlI
                                >< MaeI           >< HphI
CCTGCTAAAG CATATAAGGA TTACCTAGCA AGTGGAGGAC AACCAATCAC CAACTGTGTG AAGATGTTGT
13030      13040      13050      13060      13070      13080      13090

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                >< NspHII
                                >< NlaIII
                                >< Eco47I
                                >< Eam1105I
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                >< Bme18I >< XcmI
                                >< AvaII   >< PleI ><
                                >< AfaI           >< AfaI           >< MaeIII           >< AluI           >< AsuI > < HinfI
GTACACACAC TGGTACAGGA CAGGCAATTA CTGTAACACC AGAAGCTAAC ATGGACCAAG AGTCCTTTGG
13100      13110      13120      13130      13140      13150      13160

                                >< TfiI
                                >< SfaNI
                                >< NlaIII           >< FokI           >< HinfI           >< MaeIII
TGGTGCTTCA TGTTGTCTGT ATTGTAGATG CCACATTGAC CATCCAAATC CTAAAGGATT CTGTGACTTG
13170      13180      13190      13200      13210      13220      13230

                                > < RsaI
                                >< MaeII
                                >< Csp6I
                                > < AfaI           >< BsrI           >< DdeI
                                >< BsrI           >< BfrI
AAAGGTAAGT ACGTCCAAAT ACCTACCACT TGTGCTAATG ACCCAGTGGG TTTTACACTT AGAAACACAG
13240      13250      13260      13270      13280      13290      13300

                                >< ThaI

```

FIGURE 13.30

EP 1 694 829 B1

```

                                                                 >< SfaNI
                                                                 >< MvnI
                                                                 >< BstUI
                                                                 >< Bsp50I
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI  >< AciI
    TCTGTACCGT CTGCGGAATG TGGAAAGGTT ATGGCTGTAG TTGTGACCAA CTCCGCGAAC CCTTGATGCA
    13310      13320      13330      13340      13350      13360      13370
                                                                 >< SfcI >< MaeIII
                                                                 >< AccIISfaNI ><
    >< Zsp2I
    > < SfaNI
    >< Mph1103I>< Tru9I
    >< Ppu10I>< MaeII
    >< NsiI> < FokI
    >< EcoT22I >< MseI
    >< AciI>< AvaIII   >< DraI
    GTCTGCGGAT GCATCAACGT TTTTAAACGG GTTTGCGGTG TAAGTCAGC CCGTCTTACA CCGTGCGGCA
    13380      13390      13400      13410      13420      13430      13440
    >< Fnu4HI ><
    BsgI ><
    >< BbvI
    >< AciI ><
    >< Fnu4HI
    >< AciI ><
    >< SpeI
    >< ScaI
    >< RsaI
    >< RmaI
    >< MaeI
    > < Csp6I   >< SfcI
    >< BspWI   >< AfaI   >< AccI   >< BcgI/a
    CAGGCACTAG TACTGATGTC GTCTACAGGG CTTTTGATAT TTACAACGAA AAAGTTGCTG GTTTTCAGAA
    13450      13460      13470      13480      13490      13500      13510
    >< BspWI
    BcgI >
    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< MnlI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BslI
    >< DsaV >< BsiYI
    >< BsiLI
    >< ApyI
    >< PleI
    > < FokI >< HinfI
    GTTCCTAAAA ACTAATTGCT GTCGCTTCCA GGAGAAGGAT GAGGAAGGCA ATTTATTAGA CTCTTACTTT
    13520      13530      13540      13550      13560      13570      13580
    >< NlaIII
    >< Ksp632I
    >< EarI
    >< Eam1104I
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< BsmAI
    >< Tru9I
    >< MnlI
    >< Alw26I
    >< MboII >< MseI
    GTAGTTAAGA GGCATACTAT GTCTAACTAC CAACATGAAG AGACTATTTA TAACTTGGTT AAAGATTGTC
    13590      13600      13610      13620      13630      13640      13650
    >< RsaI
    >< NlaIV
    > < NlaIII
    >< KpnI
    >< HphI
    > < Eco64I
    >< Csp6I
    >< BscBI
    > < BanI
    > < Asp718

```

FIGURE 13.31

EP 1 694 829 B1

```

                                >> MaeIII >> AfaI
                                > < AccB1I MaeII ><
    >< NspBII
    >< AciI                >< NlaIII                > < Acc65I > < HgaI
CAGCGGTTGC TGTCCATGAC TTTTTC AAGT TTAGAGTAGA TGGTGACATG GTACCACATA TATCACGTCA
    13660      13670      13680      13690      13700      13710      13720

                                >< MnlI
                                >< MaeII
GCGTCTAACT AAATACACAA TGGCTGATTT AGTCTATGCT CTACGTCATT TTGATGAGGG TAATTGTGAT
    13730      13740      13750      13760      13770      13780      13790

    >< Tru9I
    >< MseI                >< MaeIII >< MunI
ACATTAAAAG AAATACTCGT CACATACAAT TGCTGTGATG ATGATTATTT CAATAAGAAG GATTGGTATG
    13800      13810      13820      13830      13840      13850      13860

                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< MluI
                                >< BstUI
                                >< Bsp50I
                                >< RsaI
                                >< HphI
    >< TfiI                >< AflIII                >< DdeI                >< Csp6I Tru9I ><
    >< HinfI                >< AccII                >< BfrI                >< AfaI MseI ><
ACTTCGTAGA GAATCCTGAC ATCTTACGCG TATATGCTAA CTTAGGTGAG CGTGACGCC AATCATTATT
    13870      13880      13890      13900      13910      13920      13930

                                XhoII >
                                Sau3AI >
                                NdeII >
                                MflI >
    > < SfaNI
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI                >< SfaNI
                                >< RsaI
                                > < Csp6I
                                >< BspWI
                                >< AfaI
AAAGACTGTA CAATTCTGCG ATGCTATGCG TGATGCAGGC ATTGTAGGCG TACTGACATT AGATAATCAG
    13940      13950      13960      13970      13980      13990      14000

                                > < ScrFI
                                > < MvaI
                                >< Fnu4HI
                                >< EcoRII
                                > < Ecl136I
                                > < BstOI
                                > < BstNI
    >< Tru9I
    >< MseI                >< RsaI
    >< DpnI                >< Csp6I
    >< Bsp143I            >< BsrI
    >< AlwI                >< AfaI
                                >< RsaI
                                > < HphI
                                >< Csp6I
                                > < BsiLI
                                > < BbvI
                                > < ApyI
                                >< AfaI
                                >< DsaV
                                >< AciI
GATCTTAATG GGAACTGGTA CGATTTCGGT GATTTCGTAC AAGTAGCACC AGGCTGCGGA GTTCCTATTG
    14010      14020      14030      14040      14050      14060      14070

                                >< SfaNI
                                > < HinfI
                                >< RmaI
                                >< MnlI
                                >< Fnu4HIpleI ><
    >< TfiI                >< SfaNI
    >< HinfI                >< FokI
                                >< MamI
                                >< BsiBI
                                >< MaeI
                                >< DdeI
TGGATTCATA TTAATCATTG CTGATGCCCA TCCTCACTTT GACTAGGGCA TTGGCTGCTG AGTCCCATAT
    14080      14090      14100      14110      14120      14130      14140

                                >< BsaBI
                                >< BbvI
                                >< BspWI NdeI ><

    >< Sau3AI
    >< NdeII

```

FIGURE 13.32

EP 1 694 829 B1

```

>< MboI
>< MamI
>< DpnII
  >< DpnI
    >< BspWI
  >< BspAI
    >< BspI43I
  >< BsiBI
  >< BsaBI >< FokI
GGATGCTGAT CTCGCAAAAC CACTTATTAA GTGGGATTG CTGAAATATG ATTTTACGGA AGAGAGACTT
14150      14160      14170      14180      14190      14200      14210

    > < SinI
    > < Sau96I
    > < NspIV
      >< NspHII
    >< TthHB8I
    >< TaqI
      >< McrI
      > < Ksp632I
      > < EarI
      > < Eam1104I
    >< BsmAI
>< MboII
  >< Alw26I
  >< BsiEI>
  >< DraI
  >< MseI
  >< Tru9I
  >< AvaII
  >< AsuI
  >< MunI
  >< MseI
TGTCTCTTCG ACCGTTATTT TAAATATTGG GACCAGACAT ACCATCCCAA TTGTATTAAC TGTTTGGATG
14220      14230      14240      14250      14260      14270      14280

    SinI ><
    Sau96I ><
    NspIV ><
    NspHII >
    Eco47I ><
    Cfr13I ><
    Bsi2I ><
    Bme18I ><
    AvaII ><
    AsuI ><
    >< FokI
    >< MseI
ATAGGTGTAT CCTTCATTGT GCAAACHTTA ATGTGTTATT TTCTACTGTG TTCCACCTA CAAGTTTTGG
14290      14300      14310      14320      14330      14340      14350

    >< SpeI
    >< RmaI
    >< MaeI
    >< SspI
    >< BsrI
ACCACTAGTA AGAAAAATAT TTGTAGATGG TGTTCCTTTT GTTGTTCCTCAA CTGGATACCA TTTTCGTGAG
14360      14370      14380      14390      14400      14410      14420

    >< ThaI>< Esp3I
    >< DdeI
    >< BstUI
    >< Bsp50I >< BsmBI
    >< MvnI>< BsmAI
    >< HgaI>< AluI >< Alw26I
    >< AfaI
    >< FokI >< AccII > < BbvI
TTAGGAGTCG TACATAATCA GGATGTAAAC TTACATAGCT CGCGTCTCAG TTTCAAGGAA CTTTTAGTGT
14430      14440      14450      14460      14470      14480      14490

    >< Zsp2I
    >< SphI
  >< Ppu10I
    >< PaeI
    >< NspI

```

FIGURE 13.33

EP 1 694 829 B1

```

    >> Sau3AI          >> NspHI
    >> NdeII          >> NsiI
    >> MboI           >> NlaIII
    >> DpnII          >> Mph1103I
    > < DpnI         >< Fnu4HI
    >> Fnu4HI>> BspWI >> EcoT22I
    >> BspAI          >> BspWI
    > < Bsp143I> < AvaIII > < AlwNI
    >> AlwI          >> AluI    >> AluI    >> BbvI    >> MaeI
    ATGCTGCTGA TCCAGCTATG CATGCAGCTT CTGGCAATTT ATTGCTAGAT AAACGCACTA CATGCTTTTC
    14500      14510      14520      14530      14540      14550      14560
                                     >> ScrFI
                                     >> NciI
                                     >> MspI
                                     >> HpaII
                                     >> HapII
    >> Fnu4HI
    >> AlwNI
    >> AluI
    AGTAGCTGCA CTAACAAACA ATGTTGCTTT TCAAACCTGTC AAACCCGGTA ATTTTAATAA AGACTTTTAT
    14570      14580      14590      14600      14610      14620      14630
                                     >> Tru9I
                                     >> MseI
                                     >> DsaV    >> Tru9I
                                     >> BcnI    >> MseI
    AGTACTGCTG TGTCTAAAGG TTTCTTTAAG GAAGGAAGTT CTGTTGAACT AAAACACTTC TTCTTTGCTC
    14640      14650      14660      14670      14680      14690      14700
                                     >> MboII
                                     >> DdeI >>
                                     >> BbvI >>
    GACTTTGCTG TGTCTAAAGG TTTCTTTAAG GAAGGAAGTT CTGTTGAACT AAAACACTTC TTCTTTGCTC
    14640      14650      14660      14670      14680      14690      14700
                                     >> FokI
                                     >> Fnu4HI
                                     EcoRV >>
                                     Eco32I >>
    AGGATGCAA CGCTGCTATC AGTGATTATG ACTATTATCG TTATAATCTG CCAACAATGT GTGATATCAG
    14710      14720      14730      14740      14750      14760      14770
                                     >> VspI
                                     >> Tru9I
                                     >> MseI
                                     >> AsnI
                                     >> AseI
    ACAACTCCTA TTCGTAGTTG AAGTTGTTGA TAAATACTTT GATTGTTACG ATGGTGGCTG TATTAATGCC
    14780      14790      14800      14810      14820      14830      14840
                                     >> MaeIII
    >> Tru9I
    >> MseI
    >> HpaI
    >> HindII
    >> HincII
    AACCAAGTAA TCGTTAACAA TCTGGATAAA TCAGCTGGTT TCCCATTTAA TAAATGGGGT AAGGCTAGAC
    14850      14860      14870      14880      14890      14900      14910
                                     >> PvuII
                                     >> Psp5I
                                     > < XcmI
                                     >> Tru9I
                                     >> MseI
                                     RmaI >>
                                     MaeI >>
    >> SfaNI
    >> Sau3AI
    >> NdeII
    >> MboI
    >> DpnII
    >> DpnI
    >> PleI
    >> HinfI>> MnlI
    >> Bsp143I
    >> BspAI
    >> AlwI
    TTTATTATGA CTCAATGAGT TATGAGGATC AAGATGCAC TTTTCGGTAT ACTAAGCGTA ATGTCATCCC
    14920      14930      14940      14950      14960      14970      14980
                                     >> Bst1107I
                                     >> BspWI >> FokI
                                     >> Bsp50I
                                     >> AccII>> DdeI
                                     >> AccI
    >> SstI
    >> SduI
    >> SacI

```

FIGURE 13.34

EP 1 694 829 B1

```

AGGTGGAACA TCATCCGGTG ATGCTACAAC TGCTTATGCT AATAGTGTCT TTAACATTTG TCAAGCTGTT
  15410      15420      15430      15440      15450      15460      15470

>< BspWI
ACAGCCAATG TAAATGCACT TCTTTCAACT GATGGTAATA AGATAGCTGA CAAGTATGTC CGCAATCTAC
  15480      15490      15500      15510      15520      15530      15540

>< DrdI
>< AluI
> < AciI
>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
> < MamI
>< FbaI
>< DpnII
>< DpnI
>< BspHI
>< BspAI
>< BspI43I
>< BsiQI
>< SfcI
>< BsmAI
>< Alw26I
AACACAGGCT CTATGAGTGT CTCTATAGAA ATAGGGATGT TGATCATGAA TTCGTGGATG AGTTTTACGC
  15550      15560      15570      15580      15590      15600      15610

>< TfiI
>< SfaNI
>< NlaIII
>< BspMI
>< HinfI
TTACCTGCGT AAACATTTCT CCATGATGAT TCTTTCTGAT GATGCCGTTG TGTGCTATAA CAGTAACTAT
  15620      15630      15640      15650      15660      15670      15680

> < RmaI
>< NheI >< Tru9I
>< Fnu4HI
> < MaeI >< Tru9I
>< AciI
>< AluI >< MseI >< MseI
MnlI ><
GCGGCTCAAG GTTTAGTAGC TAGCATTAAG AACTTTAAGG CAGTTCTTTA TTATCAAAAT AATGTGTTCA
  15690      15700      15710      15720      15730      15740      15750

>< SinI
>< Sau96I
>< PssI
>< Psp5II
>< PpuMI
>< NspIV
>< NspHII
>< Eco0109I
>< Eco47I
>< DraII
>< Cfr13I
>< BsiZI
>< Bme18I
>< DdeI
>< NlaIII
>< BsmAI
>< DdeI
>< Alw26I
>< AsuI
>< MnlI
TGCTGAGGC AAAATGTTGG ACTGAGACTG ACCTTACTAA AGGACCTCAC GAATTTTGCT CACAGCATAAC
  15760      15770      15780      15790      15800      15810      15820

>< XhoI
>< Sau3AI
>< NdeII
>< MflI
>< MboI

```

FIGURE 13. 36

EP 1 694 829 B1

```

                >> RsaI          >> DpnII
            >> MaeII          >> DpnI          > < SspI
                >> Csp6I          >> BstYI          HinPII >>
    >> Tru9I          >> BsaAI          >> BspMI          Hin6I >>
    >> RmaI          >> AflIII          >> BspAI          HhaI >>
    >> MaeI          >> AfaI          >> AlwI >> Bsp143I          CfoI >>
>> BspWI >> MseI
AATGCTAGTT AAACAAGGAG ATGATTACGT GTACCTGCCT TACCCAGATC CATCAAGAAT ATTAGGCGCA
    15830      15840      15850      15860      15870      15880      15890

                >> RsaI          >> SfaNI
            >> TthHB8I          >> Csp6I          >> MaeIII
            >> TaqI          >> AfaI          BsrI >>
GGCTGTTTTG TCGATGATAT TGTCAAAAACA GATGGTACAC TTATGATTGA AAGGTTCTGTG TCACCTGGCTA
    15900      15910      15920      15930      15940      15950      15960

    > < FokI
    >> BspWI
TTGATGCTTA CCCACTTACA AAACATCCTA ATCAGGAGTA TGCTGATGTC TTCACTTGT ATTTACAATA
    15970      15980      15990      16000      16010      16020      16030

                >> Van91I
                >> PflMI
                >> NspI
            > < PalI >> NspHI
            > < MscI >> NlaIII
            > < HaeIII
            > < BsuRI
                >> BsrI
            >> EaeI >> BslI >> NspI
            > < BshI >> BsiYI >> NspHI
                >> NlaIII          >> AflIII >> AflIII
    >> MaeIII          >> AluI > < BalI >> AccB7I >> NlaIII
CATTAGAAAG TTACATGATG AGCTTACTGG CCACATGTTG GACATGTATT CCGTAATGCT AACTAATGAT
    16040      16050      16060      16070      16080      16090      16100

                >> RsaI > < NlaIV
                >> MnlI
            >> Csp6I >> DdeI          >> RsaI
                >> BsrI >> MnlI          >> Csp6I
            >> AfaI > < BscBI          >> AfaI          SfcI >>
AACACCTCAC GGTACTGGGA ACCTGAGTTT TATGAGGCTA TGACACACC ACATACAGTC TTGCAGGCTG
    16110      16120      16130      16140      16150      16160      16170

                >> NlaIV
                >> EcoNI
                >> Eco31I
            >> Eco64I >> BsmAI
            >> BscBI >> BslI
            >> BanI >> BsiYI
            >> AciI >> BsaI
            >> AccB1I >> Alw26I BbvI >>
>> BspWI
TAGGTGCTTG TGTATTGTGC AATTACAGAG CTTCACTTCG TTGCGGTGCC TGTATTAGGA GACCATTCCT
    16180      16190      16200      16210      16220      16230      16240

                >> Tth111I
            >> Fnu4HI >> NlaIII          > < Tru9I
            >> BspWI >> AspI          > < MseI
ATGTTGCAAG TGCTGCTATG ACCATGTCAT TTCAACATCA CACAAATTAG TGTTGTCTGT TAATCCCTAT
    16250      16260      16270      16280      16290      16300      16310

                >> ScrFI
                >> MvaI

```

FIGURE 13.37

EP 1 694 829 B1

```

>< EcoRII
  >< Ecl136I
>< DsaV
  >< BstOI
  >< BstNI
  >< BsiLI
    >< RmaI
>< BsaJI
  >< MnlI
    BspWI ><
  >< ApyI
  >< MaeIII >< MaeIII
    >< MaeI
    >< AluI
GTTTGCAATG CCCAGGTTG TGATGTCAC TATGTGACAC AACTGTATCT AGGAGGTATG AGCTATTATT
  16320      16330      16340      16350      16360      16370      16380

  >< MaeIII
    >< MnlI
GCAAGTCACA TAAGCCTCCC ATTAGTTTTT CATTATGTGC TAATGGTCAG GTTTTTGGTT TATACAAAAA
  16390      16400      16410      16420      16430      16440      16450

  >< NspI
  >< NspHI
  >< NlaIII>< MaeIII>< MaeIII
  >< AflIII
    >< AspI
    >< AflIII
CACATGTGTA GGCAGTGACA ATGTCAC TCTCAATGCG ATAGCAACAT GTGATTGGAC TAATGCTGGC
  16460      16470      16480      16490      16500      16510      16520

    >< RsaI
    >< PleI
    >< DdeI
  >< Csp6I
    >< BsmAI >< HinfI
    >< Alw26I
    >< AfaI
    >< HindIII
    >< AluI >< Fnu4HI >< BbvI
GATTACATAC TTGCCAACAC TTGTACTGAG AGACTCAAGC TTTTCGCAGC AGAAACGCTC AAAGCCACTG
  16530      16540      16550      16560      16570      16580      16590

    >< ThaI
    >< ScaI
    >< RsaI >< RsaI
    >< MvnI
  >< Csp6I >< Csp6I
    >< BstUI
    >< Bsp50I
  >< Tru9I
  >< MseI >< NdeI
    >< AfaI >< AfaI
    >< AluI
    >< AccII
    MnlI >
AGGAAACATT TAAGCTGTCA TATGGTATTG CCACTGTACG CGAAGTACTC TCTGACAGAG AATTGCATCT
  16600      16610      16620      16630      16640      16650      16660

    MaeIII ><
    >< MaeIII
    >< EcoO65I
    >< Eco91I
    >< BstPI
    >< BstEII
  >< SfaNI
  >< NlaIII
  >< RmaI
  >< MaeI
    >< BsrI
TTCATGGGAG GTTGGAAAAC CTAGACCACC ATTGAACAGA AACTATGTCT TTAGTGGTTA CCGTGTAAC
  16670      16680      16690      16700      16710      16720      16730

    RsaI ><
    >< MnlI
    >< HphI
    >< RsaI
    >< RsaI
    >< SfaNI
    >< Csp6I >< Csp6I
    >< HphI AfaI ><
    >< AfaI
    >< AfaI
    >< MaeIII
    >< HphI AfaI ><
AAAAATAGTA AAGTACAGAT TGGAGAGTAC ACCTTTGAAA AAGGTGACTA TGGTGATGCT GTTGTGTACA
  16740      16750      16760      16770      16780      16790      16800

```

FIGURE 13. 38

EP 1 694 829 B1

```

    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
GAGGTACTAC GACATACAAG TTGAATGTTG GTGATTACTT TGTGTTGACA TCTCACACTG TAATGCCACT
    16810      16820      16830      16840      16850      16860      16870

    >< HphI
    >< HindII
    >< HincII
    DdeI ><
    BfrI ><

    >< VneI
    >< SnoI
    >< SduI
    >< NspII
    >< HgiAI
    > < SduI
    >< DraIII > < NspII
    >< Bsp1286I > < HgiAI
    >< BmyI >< BspWI >< DraIII >< RsaI
    >< ApaLI >< RmaI > < Bsp1286I >< Csp6I
    >< Alw44I >< MaeI > < BmyI >< BsrI
    >< Alw21I > < Alw21I >< AfaI DdeI >
TAGTGACCT ACTCTAGTGC CACAAGAGCA CTATGTGAGA ATTACTGGCT TGTACCCAAC ACTCAACATC
    16880      16890      16900      16910      16920      16930      16940

    StyI ><
    SinI >
    Sau96I >
    NspIV >
    EcoT14I ><
    Eco47I >
    Eco130I ><
    >< ScaI Cfr13I >
    BssT1I ><
    >< SphI >< RsaI Bsi2I >
    >< PaeI BsaJI ><
    >< NlaIII Bme18I >
    >< NspI>< Csp6I AvaII >
    >< NspHI>< AfaI AsuI >
TCAGATGAGT TTTCTAGCAA TGTGCAAAT TATCAAAAGG TCGGCATGCA AAAGTACTCT ACACTCCAAG
    16950      16960      16970      16980      16990      17000      17010

    >< ScrFI
    >< RsaI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    > < Csp6I
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< XcmI >< BslI
    >< NspHII >< BsiYI
    >< BsiLI
    >< ApyI >< BsrI
    >< DsaV>< AfaI > < HinfI>< PleI
GACCACCTGG TACTGGTAAG AGTCATTTTG CCATCGGACT TGCTCTCTAT TACCCATCTG CTCGCATAGT
    17020      17030      17040      17050      17060      17070      17080

    >< SfaNI
    >< SphI >< PvuII
    >< PaeI >< Psp5I
    >< NspI >< NspBII
    >< NspHI >< Fnu4HI > < Tru9I
    >< Bst1107I > < NlaIII>< BspWI >< SspI
    >< AccI >< NlaIII >< AluI >< BbvI > < MseI
GTATACGGCA TGCTCTCATG CAGCTGTTGA TGCCCTATGT GAAAAGGCAT TAAAATATTT GCCCATAGAT
    17090      17100      17110      17120      17130      17140      17150

```

FIGURE 13.39

EP 1 694 829 B1

```

> < ThaI
<< ThaI
> < MvnI
<< MvnI >< ThaI
> < HinPII
<< HinPII
<< HinPII >< MvnI
> < Hin6I
<< Hin6I
> < HhaI
<< HhaI >< HhaI
> < CfoI
<< CfoI >< CfoI
> < BstUI
<< BstUI >< BstUI
<< BssHII
<< BspMI
> < Bsp50I
<< Bsp50I>< Bsp50I
>> TfiI << Hin6I> < AccII RmaI >
>> HinfI << AccII >< AccII MaeI >
AAATGTAGTA GAATCATAACC TGCGCGTGCG CGCGTAGAGT GTTTTGATAA ATTCAAAGTG AATTCAACAC > < EcoRI
17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220

<< Zsp2I
<< Ppu10I
<< NsiI
<< Mph1103I
<< EcoT22I
<< BsgI > < AvaIII >> DrdI
TAGAACAGTA TGTTTTCTGC ACTGTAAATG CATTGCCAGA AACAACTGCT GACATTGTAG TCTTTGATGA
17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290

<< RmaI
<< MaeI >> MaeII
AATCTCTATG GCTACTAATT ATGACTTGAG TGTTGTCAAT GCTAGACTTC GTGCAAACA CTACGTCTAT
17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360

<< Sau3AI
<< NdeII
<< MboI
<< DpnII
<< DpnI
<< BspAI >> RmaI
<< AlwI>< Bsp143I > < AciI >> MaeI SspI ><
ATTGGCGATC CTGCTCAATT ACCAGCCCC CGCACATTGC TGAATAAAGG CACTAGAAA CCAGAATATT
17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430

<< SinI
<< Sau96I
<< NspIV >> StyI
<< NspHII >< NspI
<< Eco47I >< NspHI
<< Cfr13I >< NlaIII
<< BsiZI >< EcoT14I
<< BsgI >< Eco130I
<< Bme18I >< BssT1I
<< AvaII >< BsaJI
<< Tru9I >> AsuI> < AflIII
<< MseI
TTAATTCAGT GTGCAGACTT ATGAAAACAA TAGGTCCAGA CATGTTCCCTT GGAAGTTGTC GCCGTTGTCC
17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500

```

FIGURE 13. 40

EP 1 694 829 B1

```

                >< HindII
                >< HincII
                >< AluI
TGCTGAAATT GTTGACACTG TGAGTGCTTT AGTTTATGAC AATAAGCTAA AAGCACACAA GGATAAGTCA
 17510      17520      17530      17540      17550      17560      17570

>< AluI
GCTCAATGCT TCAAAATGTT CTACAAAGGT GTTATTACAC ATGATGTTTC ATCTGCAATC AACAGACCTC
 17580      17590      17600      17610      17620      17630      17640

                >< NlaIII

                >< MnlI
>< EcoNI
  >< BslI
  >< BsiYI
AAATAGGCGT TGTAAGAGAA TTTCTTACAC GCAATCCTGC TTGGAGAAAA GCTGTTTTTA TCTCACCTTA
 17650      17660      17670      17680      17690      17700      17710

                >< HphI
                >< AluI

                >< SfcI
                >< DdeI
                >< TfiI
                >< AluI
                >< BfrI
                >< HinfI
TAATTCACAG AACGCTGTAG CTTCAAAAAT CTTAGGATTG CCTACGCAGA CTGTTGATTC ATCACAGGGT
 17720      17730      17740      17750      17760      17770      17780

                >< Tth111I
                >< AspI
                >< HindII
                >< HincII
                >< AciI
TCTGAATATG ACTATGTCAT ATTCACACAA ACTACTGAAA CAGCACACTC TTGTAATGTC AACCGCTTCA
 17790      17800      17810      17820      17830      17840      17850

                >< XhoII
                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MflI
                >< MboI
                >< MamI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BstYI
                >< BspAI
                >< Bsp143I
                >< BsiBI
                >< BsaBI
                >< BglII
                >< BspWI
ATGTGGCTAT CACAAGGGCA AAAATTGGCA TTTTGTGCAT AATGTCTGAT AGAGATCTTT ATGACAAACT
 17860      17870      17880      17890      17900      17910      17920

                >< XbaI
                >< RmaI
                >< MaeI
                >< MaeII
                >< MaeIII
                >< BsrI
GCAATTTACA AGTCTAGAAA TACCACGTCG CAATGTGGCT ACATTACAAG CAGAAAATGT AACTGGACTT
 17930      17940      17950      17960      17970      17980      17990

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboII
                >< MboI
                >< FokI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BspAI
                >< Bsp143I
                >< NlaIV
                >< Eco64I
                >< BscBI
                >< BanI
                >< MnlI
                >< Bsp143I
                >< BbsI
                >< BsrI
                >< AccBII
                >< DdeI
>< Tru9I
>< MseI>< SfcI

```

FIGURE 13. 41

EP 1 694 829 B1

```

TTAAGGACT GTAGTAAGAT CATTACTGGT CTTATCCTA CACAGGCACC TACACACCTC AGCGTTGATA
 18000      18010      18020      18030      18040      18050      18060

                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< EcoRII
                                >< Eco57I
                                >< Ecl136I
                                >< DsaV
                                >< BstOI
                                >< BstNI
                                >< HindII>< BsiLI
                                >< HincII>< ApyI
                                >< PleI
                                >< NlaIII
                                HinfI ><
                                AccI ><
TAAAGTTCAA GACTGAAGGA TTATGTGTTG ACATACCAGG CATAACCAAAG GACATGACCT ACCGTAGACT
 18070      18080      18090      18100      18110      18120      18130

                                >< MaeIII
                                >< Eco0651
                                >< Eco91I
                                >< BstXI
                                >< BstPI
                                >< BstEII
                                >< HphI
                                >< AccII ><
                                >< AciI
                                >< ThaI ><
                                >< MvnI ><
                                >< BstUI ><
                                >< Bsp50I ><
CATCTCTATG ATGGGTTTCA AAATGAATTA CCAAGTCAAT GGTTACCCTA ATATGTTTAT CACCCGCGAA
 18140      18150      18160      18170      18180      18190      18200

                                >< XmnI
                                >< MboII
                                >< MaeIII
                                >< Asp700I
                                >< AluI >< MaeII
                                >< MnlI
                                >< SfaNI
                                >< RmaI
                                >< NlaIII
                                >< MaeI
GAAGCTATTC GTCACGTTTCG TGCCTGGATT GGCTTTGATG TAGAGGGCTG TCATGCAACT AGAGATGCTG
 18210      18220      18230      18240      18250      18260      18270

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< HpaI
                                >< RsaI
                                >< GsuI >< RmaI
                                >< HindII >< RsaI
                                >< Csp6I >< MnlI
                                >< HincII >< Csp6I
                                >< BpmI >< MaeI
                                >< DdeI >< AluI BsrI ><
                                >< AfaI >< AluI >< SfcI
                                >< BfrI >< AfaI
TGGGTACTAA CCTACCTCTC CAGCTAGGAT TTTCTACAGG TGTTAACTTA GTAGCTGTAC CGACTGGTTA
 18280      18290      18300      18310      18320      18330      18340

                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< MnlI
                                >< MaeIII
                                >< EcoRII
                                >< Eco0651
                                >< EcoNI
                                >< Eco91I
                                >< Ecl136I
                                >< DsaV Tru9I ><
                                >< DraIII
                                >< BstPI
                                >< BstOI
                                >< BstNI PmeI ><
                                >< BstEII
                                >< BslI MseI ><
                                >< BsiYI HphI ><
                                >< BsiLI DraI ><
                                >< ApyI >< BsrI

>< HindII
>< HincII
>< HphI
>< EcoRI
>< Tru9I
>< MseI

```

FIGURE 13.42

EP 1 694 829 B1

```

TGTGACT GAAAATAACA CAGAATTCAC CAGAGTTAAT GCAAAACCTC CACCAGGTGA CCAAGTTTAAA
18350      18360      18370      18380      18390      18400      18410

      >> ScrFI
      >> MvaI
      >> EcoRII
      >> Ecl136I
      >> DsaV
      >> BstOI
      >> BstNI
      >> BsiLI
      >> BsaJI
      >> NlaIII
      >> ApyI
      >> RsaI
      >> DdeI >>
      >< Tru9I>> Csp6I
      >< MseI >> AfaI
CATCTTATAC CACTCATGTA TAAAGGCTTG CCCTGGAATG TAGTGCGTAT TAAGATAGTA CAAATGCTCA
18420      18430      18440      18450      18460      18470      18480

      >> NlaIII
      >> HinPII
      >> Tth111I
      >> Hin6I
      >> HinfI
      >< HhaI
      >< AspI >> PleI
      >< CfoI >> AluI
GTGATACACT GAAAGGATTG TCAGACAGAG TCGTGTTCGT CCTTTGGGCG CATGGCTTTG AGCTTACATC
18490      18500      18510      18520      18530      18540      18550

      >> SinI
      >> Sau96I
      >> NspIV
      >> NspHII
      >> Eco47I
      >> Cfr13I
      >> ScaI
      >> BsiZI
      >> RsaI
      >> Bme18I
      >> Csp6I
      >> AvaII
      >> MaeII
      >> AfaI
      >> AsuI
      >> AflIII
      >> MaeIII>> MaeII
AATGAAGTAC TTTGTCAAGA TTGGACCTGA AAGAACGTGT TGTCTGTGTG ACAAACGTGC AACTTGCTTT
18560      18570      18580      18590      18600      18610      18620

      >< TfiI
      >< Hinfi
      >< Tth111I
      >< AspI
TCTACTTCAT CAGATACTTA TGCCTGCTGG AATCATTCTG TGGGTTTTGA CTATGTCTAT AACCCATTTA
18630      18640      18650      18660      18670      18680      18690

      >> ScrFI
      RsaI >>
      >> MvaI
      >> EcoRII
      Ecl136I >>
      >> DsaV
      Csp6I >>
      BstXI >>
      >< MaeIII
      >< EcoO65I
      >< Eco91I
      >< BstPI
      >< MaeIII >> NlaIII AfaI >>
      >< Eco57I> < BstEII
TGATTGATGT TCAGCAGTGG GGCTTTACGG GTAACCTCA GAGTAACCAT GACCAACATT GCCAGGTACA
18700      18710      18720      18730      18740      18750      18760

      >> SfaNI
      >> RmaI
      >> NspI
      >> NspHI

```

FIGURE 13.43

EP 1 694 829 B1

```

                >< NlaIII                >< RmaI
                >< MaeI                >< NlaIII                Tru9I ><
<< NlaIII    >< BspWI                >< MaeI                >< NlaIII
    > < AflIII                >< BspHI                MseI ><
TGGAATGCA CATGTGGCTA GTTGTGATGC TATCATGACT AGATGTTTAg CAGTCCATGA GTGCTTTGTT
    18770      18780      18790      18800      18810      18820      18830

    >< ThaI
    >< MvnI
    >< HinPII
    >< Hin6I
    >< HhaI
    >< CfoI
    >< BstUI
    >< Bsp50I                >< EcoNI> < MnlI
    >< AccII                >< BslI                >< Tru9I
                >< BsiYI                >< DdeI >< MseI
AAGCGCGTTG ATTGGTCTGT TGAATACCCT ATTATAGGAG ATGAACTGAG GGTAAATTCT GCTTGCAGAA
    18840      18850      18860      18870      18880      18890      18900

    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI    >< NlaIII                >< BspWI                >< MboII                > < NlaIII
                >< BsrI                >< BspHI
AAGTACAACA CATGGTTGTG AAGTCTGCAT TGCTTGCTGA TAAGTTTCCA GTTCTTCATG ACATTGGAAA
    18910      18920      18930      18940      18950      18960      18970

                >< SauI
                >< MstII
                >< Eco81I
                >< DdeI                NlaIII ><
                >< CvnI                >< EspI
                >< Bsu36I                >< Eco57I MaeIII ><
                >< Bse21I                >< DdeI
                >< AxyI                >< CelII
                >< AocI    >< MnlI    >< SfaNI    >< Bpu1102I
TCCAAAGGCT ATCAAGTGTG TGCCTCAGGC TGAAGTAGAA TGGAAGTTCT ACGATGCTCA GCCATGTTAGT
    18980      18990      19000      19010      19020      19030      19040

                >< MnlI
    >< HindIII                >< Ksp632I
    >< AluI    >< MboII                >< EarI
                >< Eam1104I
GACAAAGCTT ACAAATAGA GGAACTCTTC TATTCTTATG CTACACATCA CGATAAATTC ACTGATGGTG
    19050      19060      19070      19080      19090      19100      19110

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboI
    >< MaeII> < MaeIII
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BspAI                Hinfi >
                >< MaeIII >< Bsp143I                >< MunI                DrdI ><
TTTGTTTGTT TTGGAATTGT AACGTTGATC GTTACCCAGC CAATGCAATT GTGTGTAGGT TTGACACAAG
    19120      19130      19140      19150      19160      19170      19180

                Zsp2I ><
                >< SphI
                > < Ppu10I
                >< PaeI
                >< NspI
                >< NspHI
                >< NlaIII
    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII                Mph1103I ><

```

FIGURE 1344

EP 1 694 829 B1

```

                >< Ecl136I
                >< DsaV
                >< BstOI
                >< BstNI
                >< BsiLI
                >< ApyI
    >< PleI
AGTCTTGTCA AACTTGAAC TACCAGGCTG TGATGGTGGT AGTTTGTATG TGAATAAGCA TGCATTCCAC
19190      19200      19210      19220      19230      19240      19250

                >< Tru9I
                > < MunI
                >< TthHB8I
                >< MseI
    >< BcgI/a >< TaqI
    >< AluI
ACTCCAGCTT TCGATAAAAG TGCATTTACT AATTTAAAGC AATTGCCTTT CTTTTACTAT TCTGATAGTC
19260      19270      19280      19290      19300      19310      19320

                >< PleI
                >< NlaIII
                >< BsmAI
    >< HinfI>< Alw26I
CTTGTGAGTC TCATGGCAA CAAGTAGTGT CCGATATTGA TTATGTTCCA CTCAAATCTG CTACGTGTAT
19330      19340      19350      19360      19370      19380      19390

                SfaNI ><
                >< MaeII
                BsaAI ><
                AflIII ><
                Zsp2I >
                >< ScaI
                Ppu10I ><
                >< RsaINsiI >
                Mph1103I >
                >< SfaNEcoT22I >
                > < RsaI >< Csp6I
                >< Csp6I
                >< NlaIII> < AfaI >< AfaI
                AvaIII ><
TACACGATGC AATTTAGGTG GTGCTGTTTG CAGACACCAT GCAAATGAGT ACCGACAGTA CTTGGATGCA
19400      19410      19420      19430      19440      19450      19460

    >< FokI
TATAATATGA TGATTTCTGC TGGATTTAGC CTATGGATTT ACAAACAATT TGATACTTAT AACCTGTGGA
19470      19480      19490      19500      19510      19520      19530

                >< ScrFI
                >< MvaI
                >< MaeIII
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BsiLI
    >< ApyI
ATACATTTAC CAGGTTACAG AGTTTAGAAA ATGTGGCTTA TAATGTTGTT AATAAAGGAC ACTTTGATGG
19540      19550      19560      19570      19580      19590      19600

    >< SgrAI
    >< NaeI
    >< MspI
    >< HpaII
    >< HapII
    >< Cfr10I
                > < VspI
                > < Tru9I
                > < MseI
                > < AsnI
                > < AseI
                >< Tru9I
                >< MseI
ACACGCCGGC GAAGCACCTG TTTCCATCAT TAATAATGCT GTTTACACAA AGGTAGATGG TATTGATGTG
19610      19620      19630      19640      19650      19660      19670

```

FIGURE 13. 45

EP 1 694 829 B1

```

>< XhoII
>< Sau3AI
>< NdeII
>< MflI
>< MboI
>< DpnII
  >< DpnI
>< BstYI
>< BspAI
  >< Bsp143I
>< BglIII
GAGATCTTTG AAAATAAGAC AACACTTCCT GTTAATGTTG CATTGAGCT TTGGGCTAAG CGTAACATTA
  19680      19690      19700      19710      19720      19730      19740
                                     >< MaeIII
                                     >< EspI
                                     >< DdeITru9I ><
                                     >< CeliIMseI ><
  >< Tru9I
  >< MseI
  >< AluI
  >< Bpu1102I
                                     >< Fnu4HI
>< BsrI
  >< Tru9I
  >< MseI
  >< BbvI
  >< EcoRV
  >< Eco32I
AACCAGTGCC AGAGATTAAG ATACTCAATA ATTTGGGTGT TGATATCGCT GCTAATACTG TAATCTGGGA
  19750      19760      19770      19780      19790      19800      19810
  >< NspI
  >< NspHI
  >< NlaIII
  >< BsgI
  >< AflIII
CTACAAAAGA GAAGCCCCAG CACATGTATC TACAATAGGT GTCTGCACAA TGA CTGACAT TGCCAAGAAA
  19820      19830      19840      19850      19860      19870      19880
  >< DdeI>< MboII
  >< AccI
CCTACTGAGA GTGCTTGTTT TCACTTACT GTCTTGTTT ATGGTAGAGT GGAAGGACAG GTAGACTTT
  19890      19900      19910      19920      19930      19940      19950
  SinI ><
  Sau96I ><
  NspIV ><
  NspHII ><
  NlaIV ><
  Eco47I ><
  Cfr13I ><
  >< BslI
  BsiZI ><
  >< BsiYI
  BscBI ><
  Bme18I ><
  AvaII ><
  AsuI ><
  >< Tru9I
  >< MseI
TTAGAAACGC CCGTAATGGT GTTTTAATAA CAGAAGGTC AGTCAAAGGT CTAACACCTT CAAAGGGACC
  19960      19970      19980      19990      20000      20010      20020
  >< VspI
  >< Tru9I
  >< PleI
  >< MseI
  >< RmaI
  >< NheI
  >< MaeI
  >< MaeIII
  >< AsnI
  >< TfiI
  >< HinfI
  >< AseI
  >< HinfI
  >< MseI
  >< Tru9I ><
  >< Tru9I
  >< MseI ><
  >< MseI
AGCACAAAGCT AGCGTCAATG GAGTCACATT AATTGGAGAA TCAGTAAAAA CACAGTTTAA CTA CTTTAAAG
  20030      20040      20050      20060      20070      20080      20090
  >< DdeI
  >< BsmAI
  >< MnlI
  >< Tru9I ><
  >< DdeI

```

FIGURE 1346

EP 1 694 829 B1

```

>< AccI                                     >< Alw26I >< BfrIMseI ><
AAAGTAGACG GCATTATTCA ACAGTTGCCT GAAACCTACT TTAICTCAGAG CAGAGACTTA GAGGATTTTA
  20100      20110      20120      20130      20140      20150      20160

                                     >< TthHB8I
                                     >< TaqI
                                           >< SstI
                                           >< SduI
                                           >< SacI
                                           XhoI ><
                                           TthHB8I >
                                     > < PaeR7I
                                           TaqI >
                                     > < NspIII
                                           SlaI ><
                                           >< NspII
                                           PaeR7I ><
                                           >< HgiAI
                                           NspIII ><
                                     > < Eco88I
                                           >< MnlI
                                           Eco88I ><
                                     >< XcmI
                                           >< Eco24I
                                           Eco88I ><
                                           >< Ecl136II
                                           CcrI ><
>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
  >< DpnI
>< BspAI
  >< Bsp143I
AGCCCAGATC ACAAATGGAA ACTGACTTTC TCGAGCTCGC TATGGATGAA TTCATACAGC GATATAAGCT
  20170      20180      20190      20200      20210      20220      20230

                                     >< TthHB8I
                                     >< TaqI
                                     >< SfuI
                                     >< NspV
                                     >< LspI
                                     >< Csp45I
                                     >< BstBI
                                     >< Bsp119I
                                     >< BsiCI
                                     >< Bpu14I
                                     >< AsuII >< BcgI
                                     >< MboII
                                     >< BbsI Tru9I ><
                                     >< NlaIII >< AciIMseI ><
CGAGGGCTAT GCCTTCGAAC ACATCGTTTA TGGAGATTTC AGTCATGGAC AACTTGGCGG TCTTCATTTA
  20240      20250      20260      20270      20280      20290      20300

                                     >< HphI
                                     >< HinPII
                                     >< Hin6I
>< EspI > < HhaI >< TfiI
>< DdeI >< HaeII
>< CelII >< Eco47III >< Tru9I
>< Bpu1102I > < CfoI >< HinfI >< MseI
>< BfrI >< Bsp143II >< MnlI
ATGATAGGCT TAGCCAAGCG CTCACAAGAT TCACCACTTA AATTAGAGGA TTTTATCCCT ATGGACAGCA
  20310      20320      20330      20340      20350      20360      20370

                                     >< MstI
                                     >< HinPII
                                     >< Hin6I
                                     >< HhaI
                                     >< FspI
                                     >< FdiII
                                     >< CfoI
                                     >< SfaNI
                                     >< AviII
                                     Sau3AI ><
                                     NdeII ><
                                     MboI ><
                                     DpnII ><
                                     DpnI ><
                                     BspAI ><
                                     Bsp143I ><
CAGTGAAAAA TTAICTTCATA ACAGATGCGC AAACAGGTTT ATCAAAATGT GTGTGTTCTG TGATTGATCT
  20380      20390      20400      20410      20420      20430      20440

                                     >< TthHB8I

```

FIGURE 13.47

EP 1 694 829 B1

```

    >< Tth111I
      >< TaqI
    >< AspI          > < MaeIII          MaeIII ><
TTTACTTGAT GACTTTGTCG AGATAATAAA GTCACAAGAT TTGTCAGTGA TTTCAAAAGT GGTCAAGGTT
  20450      20460      20470      20480      20490      20500      20510

                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< FokI

    >< MunI          > < NlaIII          >< AflIII
ACAATTGACT ATGCTGAAAT TTCATTCATG CTTTGGTGTA AGGATGGACA TGTTGAAACC TTCTACCCAA
  20520      20530      20540      20550      20560      20570      20580

                                >< SfaNI
                                >< ScrFI
                                >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
                                >< BstOI          >< SfaNI
                                >< BstNI          >< RsaI   BspWI ><
                                >< BsiLI          > < Csp6I   BsmI >
                                >< BspWI          >< ApyI          >< AfaI   BscCI ><
AACTACAAGC AAGTCAAGCG TGGCAACCAG GTGTTGCGAT GCCTAACTTG TACAAGATGC AAAGAATGCT
  20590      20600      20610      20620      20630      20640      20650

    >< Eco57I >< MaeIII          >< HphI
TCTTGAAAAG TGTGACCTTC AGAATTATGG TGAAAATGCT GTTATACCAA AAGGAATAAT GATGAATGTC
  20660      20670      20680      20690      20700      20710      20720

                                > < RsaI
                                >< Csp6I
    >< Bst1107I          >< Tru9I          >< AluI
    >< AccI          >< MseI          > < AfaINlaIII ><
GCAAAGTATA CTCAACTGTG TCAATACTTA AATACACTTA CTTTAGCTGT ACCCTACAAC ATGAGAGTTA
  20730      20740      20750      20760      20770      20780      20790

                                >< ScrFI
                                >< RsaI
                                >< MvaI
    >< EcoRII >< NspBII
    >< Ecl136I          >< SduI
    > < Csp6I          >< NspII
    >< BstOI >< PvuII>< HqiAI
    >< BstNI          >< DdeI
    >< BsiLI >< Psp5I>< Bsp1286I
    >< ApyI >< AluI >< BmyI
    >< DsaV>< AfaI          >< Alw21I
TTCACTTTGG TGCTGGCTCT GATAAAGGAG TTGCACCAGG TACAGCTGTG CTCAGACAAT GGTGCCAAC
  20800      20810      20820      20830      20840      20850      20860

                                >< XhoII
                                >< Tru9I
                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
    >< TthHB8I >< MseI
                                >< MflI
                                >< MboI
                                >< MamI
                                >< DpnII
    >< TfiI >< DpnI

```

FIGURE 13. 48

EP 1 694 829 B1

```

                << BstYI                > < TfiI
                << BspAI                > < HinfI
                << HinfI>< Bsp143I        >< Esp3I        >< Tru9I
                << BsiBI                >< Tth111I    >< BsmBI        >< MseI
                << BsaBI                >< BsmAI        > < BsmAI
    << BsrI      >< TaqI >< BglIII    >< AspI        >< Alw26I    >< HgaI> < Alw26I
TGGCACACTA CTTGTTCGATT CAGATCTTAA TGACTTCGTC TCCGACGCAG ATTCTACTTT AATTGGAGAC
    20870      20880      20890      20900      20910      20920      20930

                                                    << StyI
                                                    << SinI
                                                    << Sau96I
                < < SinI                >< RmaI
                < < Sau96I            >< NspIV
                    << PssI            NspHII ><
                    << Psp5II          >< MaeI
                < < PpuMI            >< EcoT14I
                < < NspIV            >< Eco47I
                    << NspHII          >< Eco130I
                    << NlaIV          >< Cfr13I
                < < EcoO109I         >< BssT1I
                < < Eco47I            >< BsiZI
                < < DraII            >< BsaJI
                < < Cfr13I          >< Bme18I
                < < BsiZI            >< BlnI
                    << BscBI          >< AvrII
                << RsaI                >< Bme18I    >< AvaII
                > < Csp6I            >< AvaII      >< AsuI
                << AfaI                >< AsuI        AflIII ><
TGTCGAACAG TACATACGGC TAATAAATGG GACCTTATTA TTAGCGATAT GTATGACCCT AGGACCAAAC
    20940      20950      20960      20970      20980      20990      21000

    << NspI
    << NspHI
    << NlaIII >< PleI                RmaI ><
    << MaeIII      >< HinfI            MaeI ><
ATGTGACAAA AGAGAATGAC TCTAAAGAAG GGTTTTTCAC TTATCTGTGT GGATTATAAA AGCAAAAAC
    21010      21020      21030      21040      21050      21060      21070

    << ScrFI
    << MvaI
    << EcoRII
    << Ecl136I
    << DsaV
    << BstOI                Sau96I >
    << BstNI                NspIV >
    << BsiLI                Cfr13I >
    << BsaJI                BsiZI >
    << BsaJI      >< SfcI                >< BsmI        >< BsmI        AsuI >
    << ApyI                > < AluI        >< BscCI        >< BscCIHindIII ><< AluI
AGCCCTGGGT GGTTCATAG CTGTAAAGAT AACAGAGCAT TCTTGAATG CTGACCTTTA CAAGCTTATG
    21080      21090      21100      21110      21120      21130      21140

                                                    << Zsp2I
                                                    << Ppu10I
    << Pali                >< NsiI
    << HaeIII              >< Mph1103I    Tru9I ><
    << BsuRI                >< MaeIII        >< EcoT22I        >< MseI
    << BshI                >< NlaIII>< AluI    >> < BcgI        >< AvaIII >< SfaNIBcgI/a ><
GGCCATTCT CATGGTGGAC AGCTTTTGTT ACAAATGTAA ATGCATCATC ATCGGAAGCA TTTTAAATTG
    21150      21160      21170      21180      21190      21200      21210

```

FIGURE 13.49

EP 1 694 829 B1

```

>< Zsp2I
>< SphI
>< Ppu10I
>< PaeI
>< NspI
>< NspHI
>< NsiI
>< NlaIII
> < NlaIII
>< Mph1103I
>< EcoT22I
> < AvaIII >< MnlI
GGGCTAACTA TCTTGGCAAG CCGAAGGAAC AAATTGATGG CTATAACCATG CATGCTAACT ACATTTTCTG
21220 21230 21240 21250 21260 21270 21280

Tru9I ><
>< MboII >< Tru9I
>< GsuI MseI ><
>< BsrI >< MseI
>< BpmI MnlI ><
>< BbsI >< NlaIII >< MnlI
GAGGAACACA AATCCTATCC AGTTGTCTTC CTATTCACCTC TTTGACATGA GCAAATTTCC TCTTAAATTA
21290 21300 21310 21320 21330 21340 21350

>< Tru9I
>< MseI
>< Esp4I> < TfiI
>< BsmAI Ksp632I ><
>< Alw26I >< MboII >< EarI
>< AflIII> < HinfI Eam1104I ><
AGAGGAACTG CTGTAATGTC TCTTAAGGAG AATCAAATCA ATGATATGAT TTATTCTCTT CTGGAAAAAG
21360 21370 21380 21390 21400 21410 21420

>< Tru9I
>< MseI
>< HindII
>< HincII
>< HpaI AflIII >
GTAGGCTTAT CATTAGAGAA AACAACAGAG TTGTGGTTTC AAGTGATATT CTTGTTAACA ACTAAACGAA
21430 21440 21450 21460 21470 21480 21490

>< VneI
>< SnuI
>< SduI
>< NspII
>< HpaII
>< HgiAI
>< HapII
>< Cfr10I
>< Bsp1286I
>< MspI>< BmyI
>< ApaLI
>< Alw44I
>< NspI >< SpeI >< AgeI >< Alw21I
>< NspHI >< RmaI
>< NlaIII >< MaeI >< MaeIII
CATGTTTATT TTCTTATTAT TTCTTACTCT CACTAGTGGT AGTGACCTTG ACCGGTGCAC CACTTTTGAT
21500 21510 21520 21530 21540 21550 21560

> < AluI >< MnlI
GATGTTCAAG CTCCTAATTA CACTCAACAT ACTTCATCTA TGAGGGGGGT TTACTIONCCT GATGAAATTT
21570 21580 21590 21600 21610 21620 21630

>< Sau3AI

```

FIGURE 13. 50

EP 1 694 829 B1

```

>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
  >< DpnI          >< Tru9I
>< BspAI          >< MseI > < MboII
  >< Bsp143I       >< DdeI          >< MaeIII
TTAGATCAGA CACTCTTTAT TTAAGTCAGG ATTTATTTCT TCCATTTTAT TCTAATGTTA CAGGGTTTCA
  21640      21650      21660      21670      21680      21690      21700

  >< VspI
  >< Tru9I
  >< MseI
  >< AsnI
  >< AseI >< MaeII          >< Tru9I          >< FokI
TACTATTAAT CATACGTTG GCAACCCTGT CATACCTTTT AAGGATGGTA TTTATTTTGC TGCCACAGAG
  21710      21720      21730      21740      21750      21760      21770

                >< BslI
                >< DsaI>< BsiYI          >< NlaIII
                >< BsaJI          > < MaeIII
AAATCAAATG TTGTCCGTGG TTGGGTTTTT GGTTCTACCA TGAACAACAA GTCACAGTCG GTGATTATTA
  21780      21790      21800      21810      21820      21830      21840

                >< NspI
                >< NspHI
>< Tru9I          >< NlaIII
>< MseI          >< MaeIII
  >< HphI          >< MaeIII          >< MaeIII
TTAACAATTC TACTAATGTT GTTATACGAG CATGTAACCT TGAATTGTGT GACAACCCTT TCTTTGCTGT
  21850      21860      21870      21880      21890      21900      21910

  >< StyI
  >< NlaIII
  >< NcoI >< RsaI
  >< EcoT14I
  >< Eco130I
  >< DsaI>< Csp6I
  >< BssT1I
  >< BsaJI>< AfaI
                >< Zsp2I
                >< Tru9I
                >< Ppu10I TthHB8I ><
                >< NsiI          >< TaqI
                >< MseI          SfaNI ><
                >< Mph1103I RsaI ><
                >< TthHB8I >< EcoT22I Csp6I ><
                >< TaqI >< AvaIII          AfaI ><
TTCTAAACCC ATGGGTACAC AGACACATAC TATGATATTC GATAATGCAT TTAATTGCAC TTTTCGAGTAC
  21920      21930      21940      21950      21960      21970      21980

                >< Tru9I
                >< MseI
                >< DraI
ATATCTGATG CCTTTTCGCT TGATGTTTCA GAAAAGTCAG GTAATTTTAA AACTTACGA GAGTTTGTGT
  21990      22000      22010      22020      22030      22040      22050

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BspAI
>< Tru9I
>< MseI
  >< DraI          >< SfcI          Bsp143I ><
TTAAAAATAA AGATGGGTTT CTCTATGTTT ATAAGGGCTA TCAACCTATA GATGTAGTTC GTGATCTACC
  22060      22070      22080      22090      22100      22110      22120

                >< Tru9I
  >< Tru9I          > < Tru9I          >< MseI
  >< MseI          > < MseI          >< MnlI
TTCTGGTTTT AACACTTTGA AACCTATTTT TAAGTTGCCT CTTGGTATTA ACATTACAAA TTTTAGAGCC
  22130      22140      22150      22160      22170      22180      22190

```

FIGURE 13.51

EP 1 694 829 B1

```

> < SduI>< SfcI
  >< PvuII
  >< Psp5I
> < NspII
  >< NspBII
> < MaeII > < Fnu4HI
> < Bsp1286I >< PstI          Tru9I >
  >< BmyI>< Fnu4HI          MseI >
  >< BspMI          >< BbvI          >< AluI          >< BbvI >
  >< HphI
ATTCTTACAG CCTTTTCACC TGCTCAAGAC ATTTGGGGCA CGTCAGCTGC AGCCTATTTT GTTGGCTATT
  22200      22210      22220      22230      22240      22250      22260

  >< SfaNI
  >< RsaI
  > < Csp6I
  >< AfaI          >< AlwNI
TAAAGCCAAC TACATTTATG CTCAAGTATG ATGAAAATGG TACAATCACA GATGCTGTTG ATTGTTCTCA
  22270      22280      22290      22300      22310      22320      22330

  > < Tru9I
  > < MseI
  >< AluI
AAATCCACTT GCTGAACTCA AATGCTCTGT TAAGAGCTTT GAGATTGACA AAGGAATTTA CCAGACCTCT
  22340      22350      22360      22370      22380      22390      22400

  >< SauI
  >< MstII
  >< Eco81I
  >< DdeI
  >< CvnI
  >< Bsu36I
  >< Bse21I
  >< AxyI          >< TfiI
  >< MnlI          >< AocI          >< MnlI          >< HinfI          >< SspI          >< MnlI
AATTTTCAGGG TTGTTCCCTC AGGAGATGTT GTGAGATTCC CTAATATTAC AAACCTGTGT CCTTTTGGAG
  22410      22420      22430      22440      22450      22460      22470

  >< Zsp2I
  >< Ppu10I
  >< NsiI
  > < NlaIII
  >< Mph1103I
  >< EcoT22I
  >< Tru9I
  >< MseI          >< AvaIII
AGGTTTTTAA TGCTACTAAA TTCCCTTCTG TCTATGCATG GGAGAGAAAA AAAATTTCTA ATTGTTGTTGC
  22480      22490      22500      22510      22520      22530      22540

  >< SduI
  >< NspII
  >< HgiAI
  >< Bsp1286I
  >< BmyI          >< Tru9I
  >< Alw21I          >< MseI          DdeI ><
TGATTACTCT GTGCTCTACA ACTCAACATT TTTTTCACC TTTAAGTGCT ATGGCGTTTC TGCCACTAAG
  22550      22560      22570      22580      22590      22600      22610

  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
  >< DpnII
  >< DpnI

```

FIGURE 13.52

EP 1 694 829 B1

```

    >< BspAI
      >< Bsp143I
TTGAATGATC TTTGCTTCTC CAATGTCTAT GCAGATTCTT TTGTAGTCAA GGGAGATGAT GTAAGACAAA
  22620      22630      22640      22650      22660      22670      22680

    >< TfiI
      >< HinfI

    >< ScrFI
      >< MvaI
    >< HinPII
    >< Hin6I
    >< HhaI
    >< HaeII
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< CfoI
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< Bsp143II
    >< BsiLI
    >< ApyI      > < BsrI
TAGCGCCAGG ACAAACTGGT GTTATTGCTG ATTATAATTA TAAATGCCA GATGATTTCa TGGGTTGTGT
  22690      22700      22710      22720      22730      22740      22750

    >< NlaIII

    >< SfaNI
    >< RmaI
    >< MaeI
    >< BsrI
    >< DdeI ><
    >< BfrI ><
CCTTGCTTGG AATACTAGGA ACATTGATGC TACTTCAACT GGTAATTATA ATTATAAATA TAGGTATCTT
  22760      22770      22780      22790      22800      22810      22820

    >< Sau96I
    >< Pali
    >< NspIV
  > < HindIII
    >< HaeIII
    >< Eco0109I
    >< DraII
    >< DdeI
    >< Cfr13I
    >< BsuRI
    >< BsiZI
    >< BshI
    >< BfrI >< PssI
    >< NlaIII >< AsuI>< BsmAI
    >< AluI      >< Alw26I
AGACATGGCA AGCTTAGGCC CTTTGAGAGA GACATATCTA ATGTGCCTTT CTCCCCTGAT GGCAAACCTT
  22830      22840      22850      22860      22870      22880      22890

    >< BspWI ><

    >< Tru9I
    >< Pali
    >< MscI
    >< HaeIII
    >< EaeI>< MseI
    >< Tru9I    >< BsuRI
    >< MseI    >< BshI
    >< BspMI   >< Bali
GCACCCACC TGCTCTTAAT TGTTATTGGC CATTAAATGA TTATGGTTTT TACACCACTA CTGGCATTGG
  22900      22910      22920      22930      22940      22950      22960

    >< BsrI ><

    >< Sau96I ><
    >< PalINspIV ><
  > < MspI   NspHII ><
    >< HaeIII

```

FIGURE 13.53

EP 1 694 829 B1

```

> < HpaII Eco47I ><
  >< DsaI
  > < HapII Cfr13I ><
    >< BsuRISinI ><
      >< GdiII Bsi2I ><
        >< ScaI
          >< RsaI
            >< Csp6I
              >< AfaI
                >< Tru9I
                  >< EaeI Bme18I ><
                    >< MseI >< Cfr10I AvaII ><
                      >< DraI
                        >< BshI AsuI ><
                          CTACCAACCT TACAGAGTTG TAGTACTTTC TTTTGAACCT TTAATGCAC CGGCCACGGT TTGTGGACCA
                            22970      22980      22990      23000      23010      23020      23030

>< Tru9I
>< Tru9I
  >< PleI
    >< MseI
      >< Tru9I
        >< MseI>> BsrI
          >< MseI
            >< Hinfi
              >< BsrI
                >< AfaI
                  AAATTATCCA CTGACCTTAT TAAGAACCAG TGTGTCAATT TTAATTTTAA TGGACTCACT GGTACTGGTG
                    23040      23050      23060      23070      23080      23090      23100

>< Tru9I
>< MseI
  >< MboII
    >< HpaI
      >< HindII
        >< HincII
          TGTTAACTCC TTCTTCAAAG AGATTTCAAC CATTCAACA ATTTGGCCGT GATGTTTCTG ATTTCACTGA
            23110      23120      23130      23140      23150      23160      23170

> < XhoII
>< TthHB8I
>< TaqI
  > < Sau3AI
    > < NdeII
      > < MflI
        > < MboI
          > < DpnII
            >< DpnI
              > < BstYI
                > < BspAI
                  > < SspI
                    >< AlwI >< Bsp143I
                      >< HphI
                        TTCCGTTCGA GATCCTAAAA CATCTGAAAT ATTAGACATT TCACCTTGCT CTTTGGGGG TGTAAGTGTA
                          23180      23190      23200      23210      23220      23230      23240

>< ScrFI
>< MvaI
>< EcoRII
  >< Ecl136I
    >< DsaV
      >< BstOI
        >< BstNI
          >< BsiLI
            >< ApyI
              >< Eco57I
                >< BsgI
                  >< HincII
                    ATTACACCTG GAACAAATGC TTCACTGAA GTTGCTGTTC TATATCAAGA TGTTAACTGC ACTGATGTTT
                      23250      23260      23270      23280      23290      23300      23310

>< Sau3AI
>< NlaIII
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
  >< DpnI
    >< HinPII

```

FIGURE 13. 54

EP 1 694 829 B1

```

                >> BspWI                >> Hin6I
                >> BspAI                > < HhaI                PleI >>
>> SfcI                >> Bsp143I    >> AluI> < CfoI                >> BsrI
CTACAGCAAT TCATGCAGAT CAACTCACAC CAGCTTGGCG CATATATTCT ACTGGAAACA ATGTATTCCA
    23320         23330         23340         23350         23360         23370         23380

                >> TthHB8I
                >> TaqI
                >> SalI
                >> RtrI
                >> NspI
                >> EspI >> NspHI
                >> DdeI >> NlaIII
                >> CelII >> HindII
                >> Bpu1102I>> HincII
>> HinfI                >> AluI    >> AccI
GACTCAAGCA GGCTGTCTTA TAGGAGCTGA GCATGTCGAC ACTTCTTATG AGTGGGACAT TCCTATTGGA
    23390         23400         23410         23420         23430         23440         23450

                > < SnaBI
                >> ScaI
                >> RsaI
                >> RmaI
                >> MaeII >> MaeI
                > < Eco105I
                >> Csp6I
                > < BsaAI
                >> AfaI
>> AluI                >> MaeI
GCTGGCATTG GTGCTAGTTA CCATACAGTT TCTTTATTAC GTAGTACTAG CCAAAAATCT ATTGTGGCTT
    23460         23470         23480         23490         23500         23510         23520

                >> MunI
ATACTATGTC TTTAGGTGCT GATAGTTCAA TTGCTTACTC TAATAACACC ATTGCTATAC CTACTAACTT
    23530         23540         23550         23560         23570         23580         23590

                RsaI >>
                >> MnlI
                Csp6I >>
                AfaI >>
                >> SfcI
TTCAATTAGC ATTACTACAG AAGTAATGCC TGTTTCTATG GCTAAAACCT CCGTAGATTG TAATATGTAC
    23600         23610         23620         23630         23640         23650         23660

                > < TfiI
                > < HinfI
                >> AciI                > < AluI
ATCTGCGGAG ATTCTACTGA ATGTGCTAAT TTGCTTCTCC AATATGGTAG CTTTTCGACA CAACTAAATC
    23670         23680         23690         23700         23710         23720         23730

>> VneI
    >> SduI
    >> NspII
    >> HgiAI
>> SnoI>> DdeI                >> Sau3AI                >> PmlI
    >> Bsp1286I                >> NdeII                >> PmaCI
    >> BmyI                    >> MboI                    >> Eco72I
    >> BbvI                    >> DpnI                    >> BsaAI
>> ApaLI                    >> Bsp143I                >> BbrPI
>> Alw44I                    >> DpnII >> AlwI
    >> Alw21I                >> Fnu4HI                >> BspAI                >> AflIII
GTGCACTCTC AGGTATTGCT GCTGAACAGG ATCGCAACAC ACGTGAAGTG TTCGCTCAAG TCAAACAAAT
    23740         23750         23760         23770         23780         23790         23800

```

FIGURE 13.55

EP 1 694 829 B1

```

>< RsaI
>< Csp6I
>< AfaI
GTACAAAACC CCAACTTTGA AATATTTTGG TGGTTTTAAT TTTTCACAAA TATTACCTGA CCCTCTAAAG
    23810      23820      23830      23840      23850      23860      23870

>< MnlI
>< MnlI
>< DdeI >< MnlI
>< Tru9I >< SfaNI >< HphI NlaIII ><
>< MseI >< MaeIII BspHI ><
CCAAC TAAGA GGTCTTTTAT TGAGGACTTG CTCTTTAATA AGGTGACACT CGCTGATGCT GGCTTCATGA
    23880      23890      23900      23910      23920      23930      23940

>< XhoII
>< Sau3AI
>< StyI
>< RmaI
>< RmaI
>< NdeII
>< MaeI
>< MflI
>< EcoT14I
>< MboI
>< MstI
>< Eco130I
>< MaeI
>< HinPII
>< BssT1I >< VspI >< DpnII
>< Hin6I
>< BsmI >< HphI >< DpnI
>< HhaI
>< BscCI >< Tru9I >< BstYI
>< FspI
>< BsaJI >< MseI >< BspAI
>< FdiII
>< BlnI >< AsnI >< Bsp143I
>< CfoI
>< AvrII >< AseI >< BglII
>< AviII
AGCAATATGG CGAATGCCTA GGTGATATTA ATGCTAGAGA TCTCATTGT GCGCAGAAGT TCAATGGACT
    23950      23960      23970      23980      23990      24000      24010

>< RmaIRsaI ><
>< MnlI
>< Fnu4HI
>< Fnu4HI Csp6I ><
>< BspWI >< BbvI
>< BbvI >< BspWI >< MaeIAfaI ><
TACAGTGTG CCACCTCTGC TCACTGATGA TATGATTGCT GCCTACACTG CTGCTCTAGT TAGTGGTACT
    24020      24030      24040      24050      24060      24070      24080

>< MboII
>< HinPII
>< Hin6I
>< HhaI
>< HaeII
>< Fnu4HI >< Ksp632I
>< CfoI >< EarI
>< FokI >< BspWI >< Eam1104I
>< BbvI
>< Bsp143II
GCCACTGCTG GATGGACATT TGGTGCTGGC GCTGCTCTTC AAATACCTTT TGCTATGCAA ATGGCATATA
    24090      24100      24110      24120      24130      24140      24150

Tru9I ><
MseI ><
>< MaeIII
GGTTCAATGG CATGGAGTT ACCCAAATG TTCTCTATGA GAACCAAAAA CAAATCGCCA ACCAATTTAA
    24160      24170      24180      24190      24200      24210      24220

MaeII ><
>< TfiI
>< HinfI
>< Fnu4HI
>< BbvI
>< AluI
CAAGGCGATT AGTCAAATTC AAGAATCACT TACAACAACA TCAACTGCAT TGGGCAAGCT GCAAGACGTT
    24230      24240      24250      24260      24270      24280      24290

>< Tru9I
>< MseI
>< HpaI
>< DdeI
>< HindII >< BsmI >< Tru9I
>< Tru9I >< BfrI
>< HincII >< BscCI >< MseI
>< MseI >< AluI

```

FIGURE 13. 56

EP 1 694 829 B1

```

GTTAACCAGA ATGCTCAAGC ATTAACACACA CTTGTTAAAC AACTTAGCTC TAATTTTGGT GCAATTTCAA
 24300      24310      24320      24330      24340      24350      24360

                << ThaI
                << SpoI
                << NruI
                << MvnI
                << BstUI          << TthHB8I
                << Bsp68I      << TaqI          << RsaI
                << EcoRV      << Bsp50I      << MnlI          << Csp6I          << Tru9I
                << Eco32I << AccII << MnlI          << AciI>< AfaI          << MseI
GTGTGCTAAA TGATATCCTT TCGCGACTTG ATAAAGTCGA GGCGGAGGTA CAAATTGACA GGTTAATTAC
 24370      24380      24390      24400      24410      24420      24430

                << MaeIII << BbvI          << Fnu4HI      BbvI ><
AGGCAGACTT CAAAGCCTTC AAACCTATGT AACACAACAA CTAATCAGGG CTGCTGAAAT CAGGGCTTCT
 24440      24450      24460      24470      24480      24490      24500

                << Fnu4HI          << HindII
                << BspWI          << DdeI          << HincII
GCTAATCTTG CTGCTACTAA AATGTCTGAG TGTGTTCTTG GACAATCAAA AAGAGTTGAC TTTTGTGGAA
 24510      24520      24530      24540      24550      24560      24570

                > < NspI
                > < NspHI
                > < NlaIII
                >< MaeIII
                >< NlaIII          >< MaeII
                >< MboII          >< FokI
                << Fnu4HI << BbsI          BsaAI ><
                >< AciI>< BbvI          >< AflIII
AGGGCTACCA CTTTATGTCC TTCCACAAG CAGCCCCGCA TGGTGTGTC TTCCTACATG TCACGTATGT
 24580      24590      24600      24610      24620      24630      24640

                << ScrFI
                << MvaI
                << EcoRII
                << Ecl136I
                << BstOI
                << BstNI          << HinPII
                << MnlI >< BslI          << Hin6I
                << DsaV>< BsiYI          << HhaI
                << BsiLI          << HaeII
                << BsaJI>< HphI          << CfoI          << NlaIII
                << ApyI          << Bsp143II >< BspHI          EcoNI ><
GCCATCCAG GAGAGGAACT TCACCACAGC GCCAGCAATT TGTCATGAAG GCAAAGCATA CTTCCCTCGT
 24650      24660      24670      24680      24690      24700      24710

                << MnlI
                << BslI          << Tru9I
                << BsiYI          << MseI          << MnlI
GAAGGTGTTT TTGTGTTTAA TGGCACTTCT TGGTTTATTA CACAGAGGAA CTTCTTTTCT CCACAAATAA
 24720      24730      24740      24750      24760      24770      24780

                << DdeI          << Tru9I
                << BsmAI          << SfaNI
                << SfcI          << Alw26I          << MseIAlwI ><
TTACTACAGA CAATACATTT GTCTCAGGAA ATTGTGATGT CGTTATTGGC ATCATTAACA ACACAGTTTA
 24790      24800      24810      24820      24830      24840      24850

                << Sau3AI
                << NdeII

```

FIGURE 13.57

EP 1 694 829 B1

```

>< MboI          >< PleI          > < ScaI
>< DpnII         >< MnlI          > < Ksp632I       > < RsaI
  >< DpnI         >< DdeI   >< HinfI         >< MboII
>< BspAI         >< BspWI         > < Eam1104I     >< Csp6I
  >< Bsp143I     >< AluI          > < EarI   > < AluI   > < AfaI   > < HphI
TGATCCTCTG CAACCTGAGC TTGACTCATT CAAAGAAGAG CTGGACAAGT ACTTCAAAAA TCATACATCA
  24860      24870      24880      24890      24900      24910      24920

  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
>< MamI
  >< DpnII
  >< DpnI
  >< BspAI
  >< Bsp143I
  >< BsiBI          >< Tru9I          >< HindII
  >< BsaBI          >< MseI           >< HincII          AciI ><
CCAGATGTTG ATCTTGGCGA CATTTCAGGC ATTAACGCTT CTGTCGTCAA CATTCAAAAA GAAATTGACC
  24930      24940      24950      24960      24970      24980      24990

  >< Tru9I
  > < TfiI
  >< MnlI          >< SwaI
  >< EcoNI         >< MseI
  >< BslI          > < HinfI
>< MnlI>< BsiYI   >< DraI
GCCTCAATGA GGTCGCTAAA AATTTAAATG AATCACTCAT TGACCTTCAA GAATTGGGAA AATATGAGCA
  25000      25010      25020      25030      25040      25050      25060

  >< StyI
  >< Pali
  >< HaeIII
  >< EcoT14I
  >< Ecol30I
  >< BsuRI
  >< BssTII          NlaIII ><
  >< Tru9I>< BshI          MaeIII ><
  >< MseI >< BsaJI          >< BstXI
ATATATTTAAA TGGCCTTGGT ATGTTTGGCT CGGCTTCATT GCTGGACTAA TTGCCATCGT CATGGTTACA
  25070      25080      25090      25100      25110      25120      25130

  > < SphI
  > < PaeI
  >< SpeI          > < NspI
  > < RmaI        > < NspHI
  >< NlaIII       > < NlaIII
  > < MaeI        >< MnlI>< BbvI Fnu4HI ><
ATCTTGCTTT GTTGCATGAC TAGTTGTTGC AGTTGCCTCA AGGGTGCATG CTCTTGTGGT TCTTGCTGCA
  25140      25150      25160      25170      25180      25190      25200

  >< FokI
  >< DdeI
>< MnlI >< PleI>< HinfI >< BsrI
AGTTTGATGA GGATGACTCT GAGCCAGTTC TCAAGGTGT CAAATTACAT TACACATAAA CGAACTTATG
  25210      25220      25230      25240      25250      25260      25270

  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
  >< DpnII
  > < DpnI

```

FIGURE 13. 58

EP 1 694 829 B1

```

                >< BspAI
                  > < BspI43I
                    >< BsgI      >< AlwI      >< BsrI      BspWI >
GATTTGTTTA TGAGATTTT TACTCTTGGG TCAATTACTG CACAGCCAGT AAAAATTGAC AATGCTTCTC
 25280      25290      25300      25310      25320      25330      25340

    >< ScaI
    >< RsaI
    >< Csp6I      >< SfcI
    >< AfaI      >< NlaIII      >< AciI      >< MnlI      FokI >
CTGCAAGTAC TGTTTCATGCT ACAGCAACGA TACCGCTACA AGCCTCACTC CCTTTCGGAT GGCTTGTAT
 25350      25360      25370      25380      25390      25400      25410

                > < HinPII
                > < Hin6I
                  >< HhaI      RmaI >>
                  >< HaeII      >< HinPII      NheI >>
                  >< Eco47III      >< Hin6I      MaeI >>
                  >< CfoI      >< HhaI      Fnu4HI >>
    >< BspWI      >< BspI43II      >< CfoI      AluI >>
TGGCGTTGCA TTTCTTGCTG TTTTTCAGAG CGTACCAA ATAATTGCGC TCAATAAAAG ATGGCAGCTA
 25420      25430      25440      25450      25460      25470      25480

    >< EcoNI
    >< BslI
    >< BsiYI
    >< BbvI      >< BsrI >< BbvI      > < Fnu4HI      BbvI >>
GCCCTTTATA AGGGCTTCCA GTTCATTTGC AATTTACTGC TGCTATTTGT TACCATCTAT TCACATCTTT
 25490      25500      25510      25520      25530      25540      25550

                Zsp2I >>
                Ppu10I >>
    > < SfcI      >< HinPII
    >> < PstI      >< Hin6I      >< RsaI      Mph1103I >>
    > < Fnu4HI      >< HhaI      >< Csp6I      EcoT22I >>
    >< BspMI      >< MnlI      >< CfoI      >< AfaI      >< MnlI      AvaIII >>
TGCTTGTCGC TGCAGGTATG GAGGCGCAAT TTTTGTACCT CTATGCCTTG ATATATTTTC TACAATGCAT
 25560      25570      25580      25590      25600      25610      25620

    >< SfaNI
    >< NspI
    >< NspHI
    >< NlaIII      >< SfaNI
CAACGCATGT AGAATTATTA TGAGATGTTG GCTTTGTTGG AAGTGCAAAT CCAAGAACCC ATTACTTTAT
 25630      25640      25650      25660      25670      25680      25690

                >< Bst1107I
                >< AccI      MaeIII >>
GATGCCAACT ACTTTGTTTG CTGGCACACA CATAACTATG ACTACTGTAT ACCATATAAC AGTGTCACAG
 25700      25710      25720      25730      25740      25750      25760

                >< MboII
                BstXI >>
    >< MunI >> MaeIII >> MaeIII >> Eco57I >> BbsI MnlI >
ATACAATTGT CGTACTGAA GGTGACGGCA TTTCAACACC AAAACTCAA GAAGACTACC AAATGGGTGG
 25770      25780      25790      25800      25810      25820      25830

                >< RsaI
                > < NlaIII
                >< HphI
    >> < Tru9I >> Tth111I >> Csp6I
    >< DdeI      >< DdeI >> MseI >> AspI      >< AfaI

```

FIGURE 13.59

EP 1 694 829 B1

```

TTATTCTGAG GATAGGCACT CAGGTGTTAA AGACTATGTC GTTGTACATG GCTATTTTAC CGAAGTTTAC
 25840      25850      25860      25870      25880      25890      25900

      > < HinfI>< P1eI          >> BsrI          Tru9I >>
      >> AluI >> AccI          >> SfcI >> AlwNI          >> MboII          MseI >>
TACCAGCTTG AGTCTACACA AATTACTACA GACACTGGTA TTGAAAATGC TACATTCTTC ATCTTTAACA
 25910      25920      25930      25940      25950      25960      25970

      >> Tru9I          >> TthHB8I
      >> MseI          >> TaqI          >> Ksp632I
      >> AluI          >> MboII          >> EarI BspWI >>
AGCTTGTTAA AGACCCACCG AATGTGCAAA TACACACAAT CGACGGCTCT TCAGGAGTTG CTAATCCAGC
 25980      25990      26000      26010      26020      26030      26040

      >> XhoII
      >> Sau3AI
      >> NlaIV
      >> NdeII
      >> MflI
      >> MboI
      >> DpnII
      >> DpnI
      >> BstYI
      >> BstI
      >> BspAI
      >> Bsp143I
      >> BscBI          >> RmaI          RsaI >>
      >> BamHI >> AlwI          >> MaeI          Csp6I >>
AATGGATCCA ATTTATGATG AGCCGACGAC GACTACTAGC GTGCCTTTGT AAGCACAAGA AAGTGAGTAC
 26050      26060      26070      26080      26090      26100      26110

      >> Tru9I
      >> RsaI
      >> MseI
      >> MboII
      >> MaeII          >> RsaI
      >> Csp6I          >> Csp6I          >> Tru9I >> Csp6I
      >> AfaI          >> AfaI          >> MseI          >> AfaI
GAACTTATGT ACTCATTCTG TTCGGAAGAA ACAGGTACGT TAATAGTTAA TAGCGTACTT CTTTTCTTG
 26120      26130      26140      26150      26160      26170      26180

      >> TthHB8I
      >> TaqI
      >> RmaI          >> HinP1I          >> RsaI
      >> MaeIII          >> Hin6I          Fnu4HI >>
      >> MaeI          >> RmaI          >> HhaI          >> Csp6I
      >> FokI          >> MaeI          >> CfoI >> BbvI          >> AfaI
CTTTCGTGGT ATTCTTGCTA GTCACACTAG CCATCCTTAC TCGCCTTCGA TTGTGTGCGT ACTGCTGCAA
 26190      26200      26210      26220      26230      26240      26250

      >> Tru9I
      >> MseI          >> ThaI
      >> SspI >> MaeII          >> MvnI
      >> HpaI          >> MseI
      >> HindII          >> BstUI          Ksp632I >
      >> HincII          >> MaeII >> Bsp50I          >> MboII EarI >
TATTGTTAAC GTGAGTTTGT TAAAACCAAC GGTTCACGTC TACTCGCGTG TTA AAAAATCT GAACTCTTCT
 26260      26270      26280      26290      26300      26310      26320
      >> AccI >> AccII          Eam1104I >

```

FIGURE 13.60

EP 1 694 829 B1

```

    >> Sau3AI
    >> NdeII
    >> MboI
    >> DpnII
    >> MboII>> DpnI
    >> XmnI >> BspAI> < Eco57I
    >> Asp700I>> Bsp143I
    GAAGGAGTTC CTGATCTTCT GGTCTAAACG AACTAACTAT TATTATTATT CTGTTTGAA CTTTAACATT
    26330      26340      26350      26360      26370      26380      26390

    >> ScrFI
    >> MvaI
    >> EcoRII
    >> Ecl136I
    >> DsaV NlaIV >>
    >> RsaI
    >> MnlI
    >> Tru9I
    >> BstOI
    >> Csp6I
    >> MseI
    >> BstNI RmaI >>
    >> BsiLI MaeI >>
    > < NlaIII >> AfaI > < AluI >> ApyIBscBI >>
    GCTTATCATG GCAGACAACG GTACTATTAC CGTTGAGGAG CTAAACAAC TCCTGGAACA ATGGAACCTA
    26400      26410      26420      26430      26440      26450      26460

    >> ScrFI
    >> RmaI
    >> MvaI
    >> MaeI
    >> EcoRII
    >> Ecl136I
    >> DsaV
    >> BstOI
    >> BstNI
    >> BsiLI
    >> ApyI >> MaeIII
    GTAATAGGTT TCCTATTCCT AGCCTGGATT ATGTTACTAC AATTGCGCTA TTCTAATCGG AACAGGTTTT
    26470      26480      26490      26500      26510      26520      26530

    >> Pali
    >> MscI
    >> MnlI >> MaeIII
    >> HaeIII
    >> EaeI
    >> BsuRI
    >> BsrI
    >> RsaI
    >> BspWI
    >> Csp6I >> HindIII
    >> BshI
    >> AfaI >> AluI >> BalI >> BbvI Fnu4HI >>
    TGTACATAAT AAAGCTTGTT TTCCTCTGGC TCTTGTGGCC AGTAACACTT GCTTGTTTTG TGCTTGCTGC
    26540      26550      26560      26570      26580      26590      26600

    >> VspI
    >> Tru9I
    >> MseI
    >> HphI
    >> SfcI >> AsnI >> BsrI
    >> AccI >> AseI>> MaeIII>> AciI
    TGCTACAGA ATTAATGGG TGA CTGGCGG GATTGCGATT GCAATGGCTT GTATTGTAGG CTTGATGTGG
    26610      26620      26630      26640      26650      26660      26670

    >> EspI
    >> Eco57I
    >> DdeI
    >> CelII
    >> Bpu1102I
    >> RsaI
    >> Csp6I

```

FIGURE 13.61

EP 1 694 829 B1

```

>< BfrI
  >< AluI
CTTAGCTACT TCGTTGCTTC CTTCAGGCTG TTTGCTCGTA CCCGCTCAAT GTGGTCATTC AACCCAGAAA
  26680      26690      26700      26710      26720      26730      26740

  >< AfaI
  >< AciI
  MboII >
  >< ScrFI
  >< NciI
  >< MspI
  >< HpaII
  >< HapII
  >< DsaV>< MnlI
  >< BslI
  >< BsiYI
  >< BsaJI >< MunI          > < XcmI
  >< BcnI          >< MaeIII >< AciI >< NlaIII
CAAACATTCT TCTCAATGTG CCTCTCCGGG GGACAATTGT GACCAGACCG CTCATGGAAA GTGAAC TTGT
  26750      26760      26770      26780      26790      26800      26810

  Tru9I ><
  SinI >
  Sau96I >
  PpuMI >
  NspIV >
  MseI ><
  >< MaeIII
  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
  >< FbaI
  >< DpnII
  >< DpnI
  >< BspAI
  >< Bsp143I
  >< BsiQI
  >< BclI
  >< MaeIII
  >< PalI
  >< MspI
  >< HpaII
  >< HapII
  >< HaeIII
  >< GdiII
  >< EaeI
  >< BsuRI
  >< BshI
  > < RmaI >< HaeII
  > < MaeI Eco0109I >
  >< HinPIIEco47I >
  >< StyI>< Hin6I DraII >
  >< EcoT14I Cfr13I >
  >< Eco130I>< Bsp143II
  >< BssT1I BsiZI >
  >< BsaJI Bmel8I >
  >< BlnI >< HhaI AvaII >
  >< AvrII >< CfoI AsuI >
CATTGGTGCT GTGATCATTC GTGGTCACTT GCGAATGGCC GGACACTCCC TAGGGCGCTG TGACATTAAG
  26820      26830      26840      26850      26860      26870      26880

  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
  >< DpnII
  >< DpnI
  >< PssI >< BspMI
  >< Psp5II >< BspAI
  >< NspHII >< Bsp143I
  >< XmnI
  >< Asp700I > < HgaI Fnu4HI ><
GACCTGCCAA AAGAGATCAC TGTGGCTACA TCACGAACGC TTTCTTATTA CAAATTAGGA GCGTCGCAGC
  26890      26900      26910      26920      26930      26940      26950

  >< TfiI
  >< HinfI
  >< BbvI
  >< Tru9I
  >< BbvI >< Fnu4HI >< AciI >< MseI
GTGTAGGCAC TGATTCAGGT TTTGCTGCAT ACAACCGCTA CCGTATTGGA AACTATAAAT TAAATACAGA
  26960      26970      26980      26990      27000      27010      27020

  >< MspI
  >< HpaII
  >< HapII
  >< Cfr10I
  >< BcgI/a
  >< RsaI
  >< RmaI
  >< Csp6I
  >< MaeI>< BcgI
  >< AfaI >< MaeIII
  HindII ><
  HincII ><

```

FIGURE 13.62

EP 1 694 829 B1

```

CCACGCCGGT AGCAACGACA ATATTGCTTT GCTAGTACAG TAAGTGACAA CAGATGTTTC ATCTTGTTGA
  27030      27040      27050      27060      27070      27080      27090

  << ScrFI
  << MvaI
    << MaeIII
  << EcoRII
    << Ecl136I
  << DsaV
    << BstOI
    << BstNI
    << BsiLI
    << ApyI
    << MnlI
    << TfiI
    << HinFI <<
CTTCCAGGTT ACAATAGCAG AGATATTGAT TATCATTATG AGGACTTTCA GGATTGCTAT TTGGAATCTT
  27100      27110      27120      27130      27140      27150      27160

    << BsmAI
    << Tru9I
    << MnlI
  << MaeII
    << Alw26I
    << MseI
    << DdeI
    << MboII
GACGTTATAA TAAGTTCAAT AGTGAGACAA TTATTTAAGC CTCTAACTAA GAAGAATTAT TCGGAGTTAG
  27170      27180      27190      27200      27210      27220      27230

    << Ksp632I
    << MboII
    << EarI
    << MboII
    << NlaIIIEam1104I <<
ATGATGAAGA ACCTATGGAG TTAGATTATC CATAAACGA ACATGAAAAT TATTCTCTTC CTGACATTGA
  27240      27250      27260      27270      27280      27290      27300

    << RsaI << RsaI
    << Csp6I << Csp6I
    << AluI
    << MnlI
    << AfaI << AfaI
TTGTATTTAC ATCTTGCGAG CTATATCACT ATCAGGAGTG TGTTAGAGGT ACGACTGTAC TACTAAAAGA
  27310      27320      27330      27340      27350      27360      27370

    << MnlI << HphI << HphI
    << MnlI
ACCTTGCCCA TCAGGAACAT ACGAGGGCAA TTCACCATTT CACCCTCTTG CTGACAATAA ATTTGCACTA
  27380      27390      27400      27410      27420      27430      27440

    << RmaI
    << MaeI
    << RsaI
    << Csp6I
    << BbvI
    << AfaI
    << MnlI
    << Sau3AI >
    << PvuII
    << Psp5I
    << NspBII
    << TthHB8I
    << TaqI
    << RsaI
    << Csp6I
    << BbvI
    << AfaI
    << MnlI
    << NdeII >
    << MboI >
    << Fnu4HI
    << DpnII >
    << BspAI >
    << AluI
ACTTGCACTA GCACACACTT TGCTTTTGCT TGTGCTGACG GTACTCGACA TACCTATCAG CTGCGTGCAA
  27450      27460      27470      27480      27490      27500      27510

    << SstI
    << SduI
    << SacI
    << NspII
    << HgiAI
    << Eco24I
    << Ecl136II
    << BspWI
    << Bsp1286I
    << BmyI
    << BanII
    << Alw21I
  << HphI
  << DpnI
    << MnlI

```

FIGURE 13. 63

EP 1 694 829 B1

```

>< Bsp143I          >< MnlI          > < AluI   BbvI ><
GATCAGTTTC ACCAAAACCTT TTCATCAGAC AAGAGGAGGT TCAACAAGAG CTCTACTCGC CACTTTTTCT
 27520      27530      27540      27550      27560      27570      27580

                                     SstI ><
                                     SduI ><
                                     SacI ><
                                     NspII ><
                                     HgiAI ><
                                     Eco24I ><
                                     Ecl136II ><
                                     Bsp1286I ><
                                     BmyI ><
                                     BanII ><
                                     Alw21I ><
                                     AluI ><
>< Fnu4HI          >< RmaI   >< Tru9I
>< MaeI          >< MseI          >< Tru9I
>< Fnu4HI          >< HphI          >< MseI          >< MseI
CATTGTTGCT GCTCTAGTAT TTTTAATACT TTGCTTCACC ATTAAGAGAA AGACAGAATG AATGAGCTCA
 27590      27600      27610      27620      27630      27640      27650

>< Tru9I          >< Tru9I
>< MseI          >< MseI
CTTTAATTGA CTTCTATTTG TGCTTTTTAG CCTTTCTGCT ATTCCTTGTT TTAATAATGC TTATTATATT
 27660      27670      27680      27690      27700      27710      27720

>< XhoII
>< XbaI
> < ScrFI
>< Sau3AI
>< RmaI
>< NdeII
> < MvaI
>< MflI
>< MboI
>< EcoRII>< MaeI
> < Ecl136I
>< DpnII
>< DpnI
>< BstYI
> < BstOI
> < BstNI
>< TthHB8I >< BspAI          > < RsaI
>< DsaV>< Bsp143I          >< MboII
> < BsiLI          >< Csp6I
>< TaqI > < ApyI > < AlwI > < AfaI          >< NlaIII
TTGGTTTTCA CTCGAAATCC AGGATCTAGA AGAACCTTGT ACCAAAGTCT AAACGAACAT GAAACTTCTC
 27730      27740      27750      27760      27770      27780      27790

                                     >< HinPII
                                     >< Hin6I
                                     >< HhaI
                                     >< RsaI >< HaeII
                                     >< SfcI          >< Eco47III
                                     >< Csp6I>< CfoI SfaNI ><
                                     >< AfaI >< Bsp143II
ATTGTTTTGA CTTGTATTTT TCTATGCAGT TGCATATGCA CTGTAGTACA GCGCTGTGCA TCTAATAAAC
 27800      27810      27820      27830      27840      27850      27860

>< XhoII
>< Sau3AI
>< NdeII
> < MnlI
>< MflI

```

FIGURE 13.64

EP 1 694 829 B1

```

    >< MboI
    >< DpnII
      >< DpnI      >< RsaI
    >< BstYI  >< MboII
  >< NlaIII>< BspAI      >< Csp6I >< RmaI
    >< AlwI >< Bsp143I  >< AfaI >< MaeI
CTCATGTGCT TGAAGATCCT TGTAAGGTAC AACACTAGGG GTAATACTTA TAGCACTGCT TGGCTTTGTG
  27870      27880      27890      27900      27910      27920      27930

  >< SduI
  >< RmaI
  >< NspII
  >< MaeI
  >< HgiAI
  >< Bsp1286I
  >< BmyI
  >< Alw21I
CTCTAGGAAA GGTTTTACCT TTTCATAGAT GGCACACTAT GGTTCAAACA TGCACACCTA ATGTTACTAT
  27940      27950      27960      27970      27980      27990      28000

    > < XhoII
    > < Sau3AI > < Van9I
      >< PvuII
      >< Psp5I
    > < NdeII > < PflMI
    > < MflI>< NspBII
    > < DpnII      >< HinPII
      >< Bsp143I    >< Hin6I
    > < BstYI > < BslI >< HhaI >< RmaI >< Asp718 >< Eco9I
    > < BspAI > < BsiYI>< CfoI >< MaeI >< AfaI >< BstPI
    > < MboI>< AluI>< BspWI >< BspWI >< AccB1I >< BstEII
  >< AlwI >< DpnI > < AccB7I >< AluI >< AluI >< Acc65I >< BbvI
CAACTGTCAA GATCCAGCTG GTGGTGCCT TATAGCTAGG TGTTGGTACC TTCATGAAGG TCACCAAAC
  28010      28020      28030      28040      28050      28060      28070

                                                    >< SinI
                                                    >< Sau96I
                                                    >< NspIV
NspHII ><
  NlaIV ><
    >< Eco47I
    >< Cfr13I
    >< BsiZI
  >< Fnu4HI >< RsaI
  >< Esp3I >< MaeII
    >< BsmAI >< Csp6I >< Tru9I
    >< Alw26I >< BsmBI >< MseI >< Tru9I
    >< Alw26I >< AfaI >< DraI >< MseI
GCTGCATTTA GAGACGTACT TGTTGTTTTA AATAAACGAA CAAATTAATA TGTCTGATAA TGGACCCCAA
  28080      28090      28100      28110      28120      28130      28140

                                                    >< SinI
                                                    >< Sau96I
                                                    >< NspIV
                                                    >< NspHII
                                                    >< NlaIV
                                                    >< Eco47I
                                                    >< Cfr13I
                                                    >< BsiZI
    >< SduI
    >< NspII
    >< Bsp1286I
    >< BmyI
  >< MaeII >< AciI
                                                    >< BscBI
                                                    >< Bme18I
                                                    >< AvaII
                                                    >< AsuI
                                                    >< AvaII >< TfiI
                                                    >< AsuI >< HinfI
                                                    >< MnlI

```

FIGURE 13. 65

EP 1 694 829 B1

```

TCAAACCAAC GTAGTGCCCC CCGCATTACA TTTGGTGGAC CCACAGATTC AACTGACAAT AACCAGAATG
 28150      28160      28170      28180      28190      28200      28210

                << HinPII >> StyI
                << HaeII
                > < Pali >< Hin6I >< EcoT14I
                > < HaeIII >< HhaI>< Eco130I
                << BspWI >> BssTII
                > < BsuRI >> Bsp143II
                << HgaI> < BshI >< CfoI>< BsaJI >< HgaI
GAGGACGCAA TGGGGCAAGG CCAAACAGC GCCGACCCCA AGGTTTACCC AATAATACTG CGTCTTGTT
 28220      28230      28240      28250      28260      28270      28280

                << TthHB8I
                > < ScrFI
                << Pali
                << PaeR7I
                << NspIII
                > < MvaI
                << HaeIII
                << EcoRII
                << Eco88I
                << XhoI > < Ecl136I
                << DsaV
                << BsuRI
                << SlaI > < BstOI
                << MnlI>< TaqI> < BstNI
                << CcrI > < BsiLI
                << HinfI >> BshI
                << TfiI>< BcoI>< BsaJI
                << MnlI >> DdeI >< AvaI > < ApyI
                << AluI >< DdeI > < NlaIII >< BfrI >< Ama87I >< MnlI
CACAGCTCTC ACTCAGCATG GCAAGGAGGA ACTTAGATTC CCTCGAGGCC AGGGCGTTCC AATCAACACC
 28290      28300      28310      28320      28330      28340      28350

                << SinI
                << Sau96I
                << NspIV
                << NspHII
                << Eco47I
                << Cfr13I
                << BsiZI
                << Bme18I >> < Ksp632I
                << AvaII >> < Eam1104I
                << AsuI >> < EarI > < AluI>< MboII >> << MaeIII
AATAGTGGTC CAGATGACCA AATTGGCTAC TACCGAAGAG CTACCCGACG AGTTCGTGGT GGTGACGGCA
 28360      28370      28380      28390      28400      28410      28420

                << SstI
                << SduI
                << SacI
                << NspII
                << HgiAI
                << EspI
                << Eco24I
                << Eco136II >> << StyI >> << Sau96I
                << DdeI >> << RmaI >> << Pali
                << CelII >> << MaeI >> << NspIV
                << Bsp1286I >> << EcoT14I >> << HaeIII
                << Bpu1102I >> << Eco130I >> << Cfr13I
                << BmyI >> << BsuRI
                << BanII >> << BssTII >> << BsrI
                << RsaI >> << BsaJI >> << BsiZI

```

FIGURE 13.66

EP 1 694 829 B1

```

        >> Alw21I      >> Csp6I      >> BlnI      >> BshI>> HindIII
>> HphI >> AluI      >> AfaI      >> AvrII     >> AsuI     >> AluI
AAATGAAAGA GCTCAGCCCC AGATGGTACT TCTATTACCT AGGAACTGGC CCAGAAGCTT CACTTCCCTA
28430      28440      28450      28460      28470      28480      28490

>> HinPII
>> Hin6I
>> HhaI
>> HaeII
>> CfoI          > < MnlI      >> NlaIV
>> Bsp143II     >> SfaNI    >> DdeI    >> BscBI
CGGCGCTAAC AAAGAAGGCA TCGTATGGGT TGCAACTGAG GGAGCCTTGA ATACACCCAA AGACCACATT
28500      28510      28520      28530      28540      28550      28560

>> NlaIV
>> Eco64I
>> BscBI
>> BanI
>> AciI
>> AccB1I >> BbvI      >> Fnu4HI          >> MnlI
GGCACCCGCA ATCCTAATAA CAATGCTGCC ACCGTGCTAC AACTTCCTCA AGGAACAACA TTGCCAAAAG
28570      28580      28590      28600      28610      28620      28630

                                                >> ThaI
                                                >> MnlI
                                                >> MaeII >> MvnI
                                                BstUI >>
                                                >> MnlI
                                                >> Fnu4HI      >> Ksp632I    Bsp50I >>
                                                >> BspWI      >> EarI      >> BsaAI>> AciI
>> MnlI      >> MnlI      >> AciI>> MboII      >> Eam1104I    AccII >>
GCTTCTACGC AGAGGGAAGC AGAGGCGGCA GTCAAGCCTC TTCTCGCTCC TCATCACGTA GTCGCGGTAA
28640      28650      28660      28670      28680      28690      28700

        >> ScrFI
        >> MvaI
        >> EcoRII          >> TthHB8I
        >> Ecl136I      >> RmaI
        >> DsaV>> Fnu4HI      >> NheI
        >> BstOI          >> MnlI
        >> BstNI          >> MaeI
        >> BsiLI          > < BspWI
        >> ApyI          >> BbvI      >> TaqI      >> AciI
TTCAAGAAAT TCAACTCCTG GCAGCAGTAG GGGAAATCTC CCTGCTCGAA TGGCTAGCGG AGGTGGTGAA
28710      28720      28730      28740      28750      28760      28770

        > < ThaI
        > < MvnI
>< HphI >> MnlI
> < HinPII
> < Hin6I
>> HhaI
> < BstUI      >> RmaI          PalI >>
> < Bsp50I     >> MaeI          HaeIII >>
>< BbvI >> CfoI>> Fnu4HI          BsuRI >>
> < AccII>> BspWI          >> AluI          BshI >>
ACTGCCCTCG CGCTATTGCT GCTAGACAGA TTGAACCAGC TTGAGAGCAA AGTTTCTGGT AAAGGCCAAC
28780      28790      28800      28810      28820      28830      28840

                                                RsaI >>
                                                >> MnlI
> < PalI>> MaeIII          >> Fnu4HI          MaeII >>
> < HaeIII          >> DdeI          >> DdeI
> < BsuRI      >> DdeI          Csp6I >>

```

FIGURE 13.67

EP 1 694 829 B1

```

                >> PfuI
    >> Fnu4HI
    >> BspWI
    >> BsmAI
    >> Alw26I
    >> AciI
AGCCTTTGCC GCAGAGACAA AAGAAGCAGC CCACTGTGAC TCTTCTTCCT GCGGCTGACA TGGATGATTT
 29270      29280      29290      29300      29310      29320      29330

                >> MboII
                >> Ksp632I >> GsuI
                >> MaeIII >> EarI >> Fnu4HI
                >> HinFI >> Eam1104I >> BpmI
                >> Fnu4HI >> BbvI >> AciI >> NlaIII
                >> NlaIII >> HinFI NlaIII >>
    >> FokI >> AluI >> TfiI >> DdeI >> BspHI
CTCCAGACAA CTTCAAAAT CCATGAGTGG AGCTTCTGCT GATTCAACTC AGGCATAAAC ACTCATGATG
 29340      29350      29360      29370      29380      29390      29400

                >> MaeII >> AccI
ACCACACAAG GCAGATGGGC TATGTAAACG TTTTCGCAAT TCCGTTTACG ATACATAGTC TACTCTTGTG
 29410      29420      29430      29440      29450      29460      29470

                >> Tru9I
                >> Tru9I
                >> MseI
                >> MseI
    >> XmnI >> HpaI
    >> EcoRI >> MaeIII >> HindII Tru9I >>
    >> Asp700I >> BsgI >> HincII MseI >>
CAGAATGAAT TCTCGTAACT AAACAGCACA AGTAGGTTTA GTTAACTTTA ATCTCACATA GCAATCTTTA
 29480      29490      29500      29510      29520      29530      29540

                XorII >
                TthHB8I >
                TaqI >
                Sau3AI >>
                RsaI >>
    >> ThaIPvuI >
                NdeII >>
                >> MnlI
    >> MvnIMcrI >
                MboI >>
                DpnII >>
                DpnI >>
                Csp6I >>
                >> BstUI
                >> HaeIII BspCI >
                BspAI >>
    >> TthHB8I >> Bsp50I
                >> Pali Bsp143I >>
                >> BsuRI BsiEI >
                >> BshIAfaI >>
                >> MnlI >> TaqI >> AciI
    >> MaeIII >> MnlI >> AccII
ATCAATGTGT AACATTAGGG AGGACTTGAA AGAGCCACCA CATTTCATC GAGGCCACGC GGAGTACGAT
 29550      29560      29570      29580      29590      29600      29610

                >> SduI
                >> NspII
                >> MboII >> VspI
                >> Ksp632I >> Eco24I >> Tru9I
    >> RsaI >> RmaI >> Fnu4HI >> Bsp1286I >> MseI
    >> Csp6I >> MaeI >> EarI >> BmyI >> AsnI
    >> AfaI >> BbvI > < AluI >> Eam1104I >> BanII >> AseI

```

FIGURE 13.69

EP 1 694 829 B1

```
CGAGGGTACA GTGAATAATG CTAGGGAGAG CTGCCTATAT GGAAGAGCCC TAATGTGTAA AATTAATTTT
 29620      29630      29640      29650      29660      29670      29680

                >< Tru9I   >< DdeI
                >< MseI   >< BfrI
                >< NlaIII  > < AluI
AGTAGTGCTA TCCCCATGTG ATTTTAATAG CTTCTTAGGA GAATGACAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
 29690      29700      29710      29720      29730      29740
```

FIGURE 13. 70

Sérologie SRAS : Technique N Indirect (1ère série)

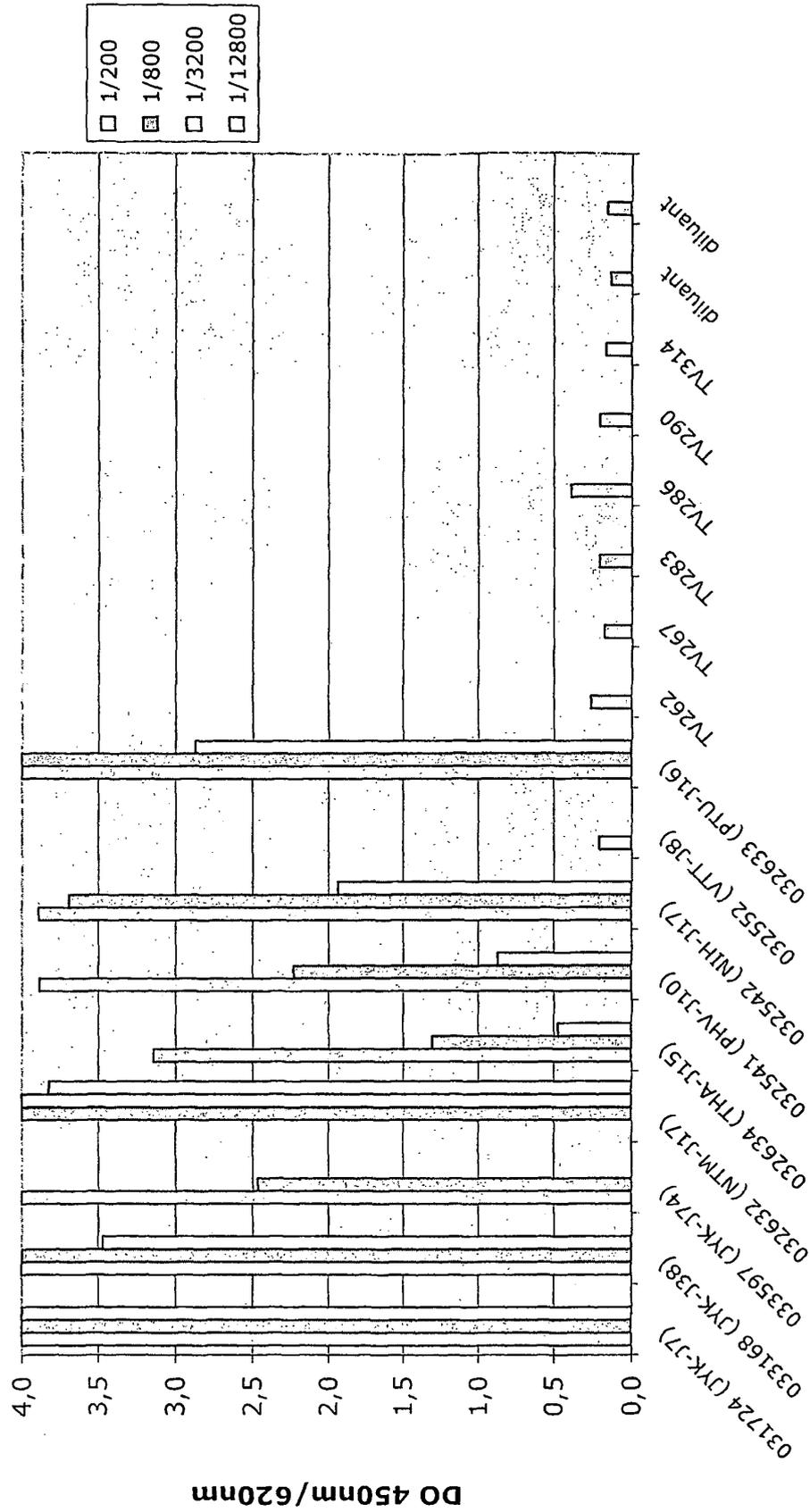


FIGURE 14

Sérologie SRAS : Technique Double Epitope (1ère série)

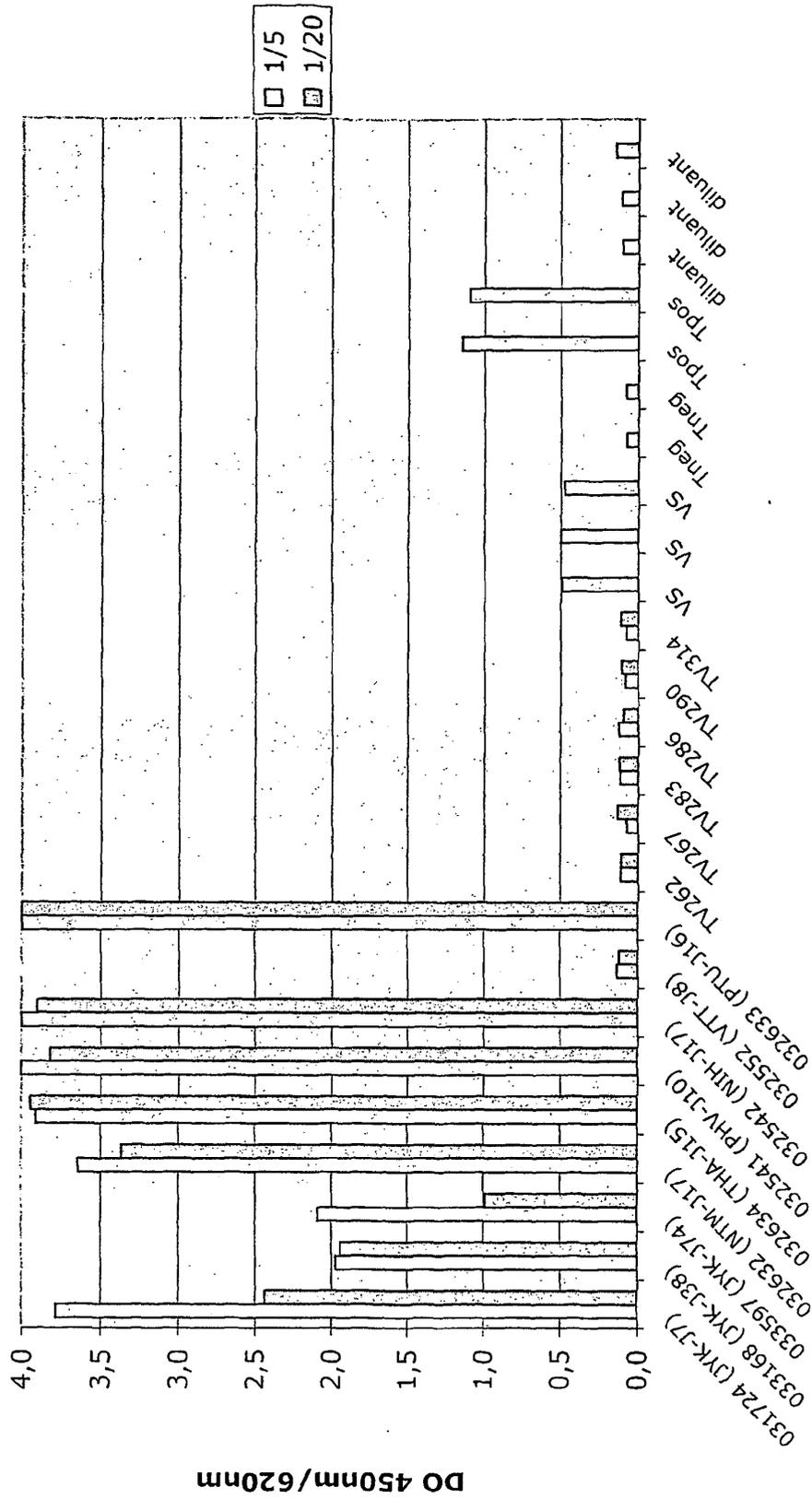


FIGURE 16

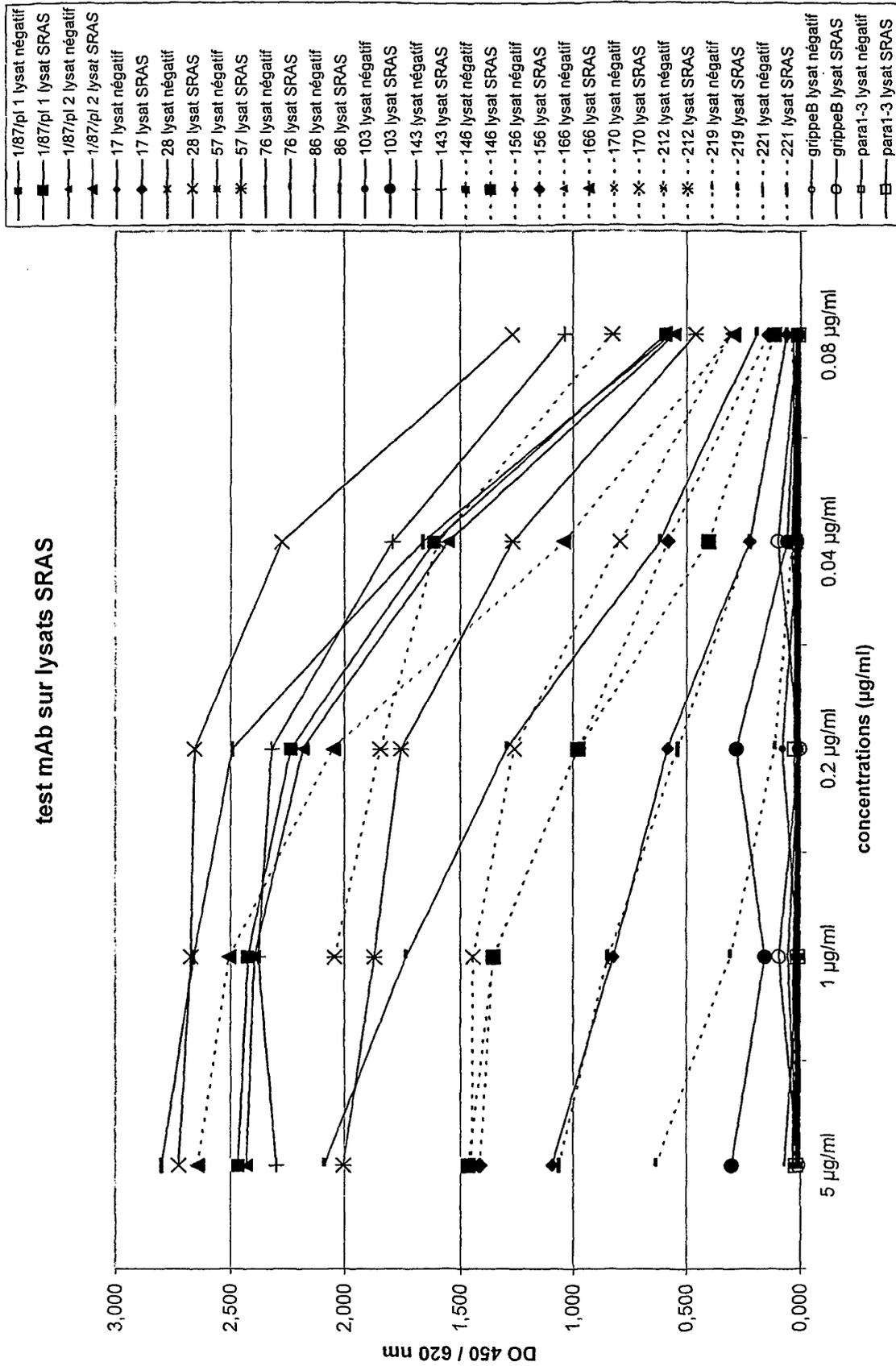


FIGURE 18

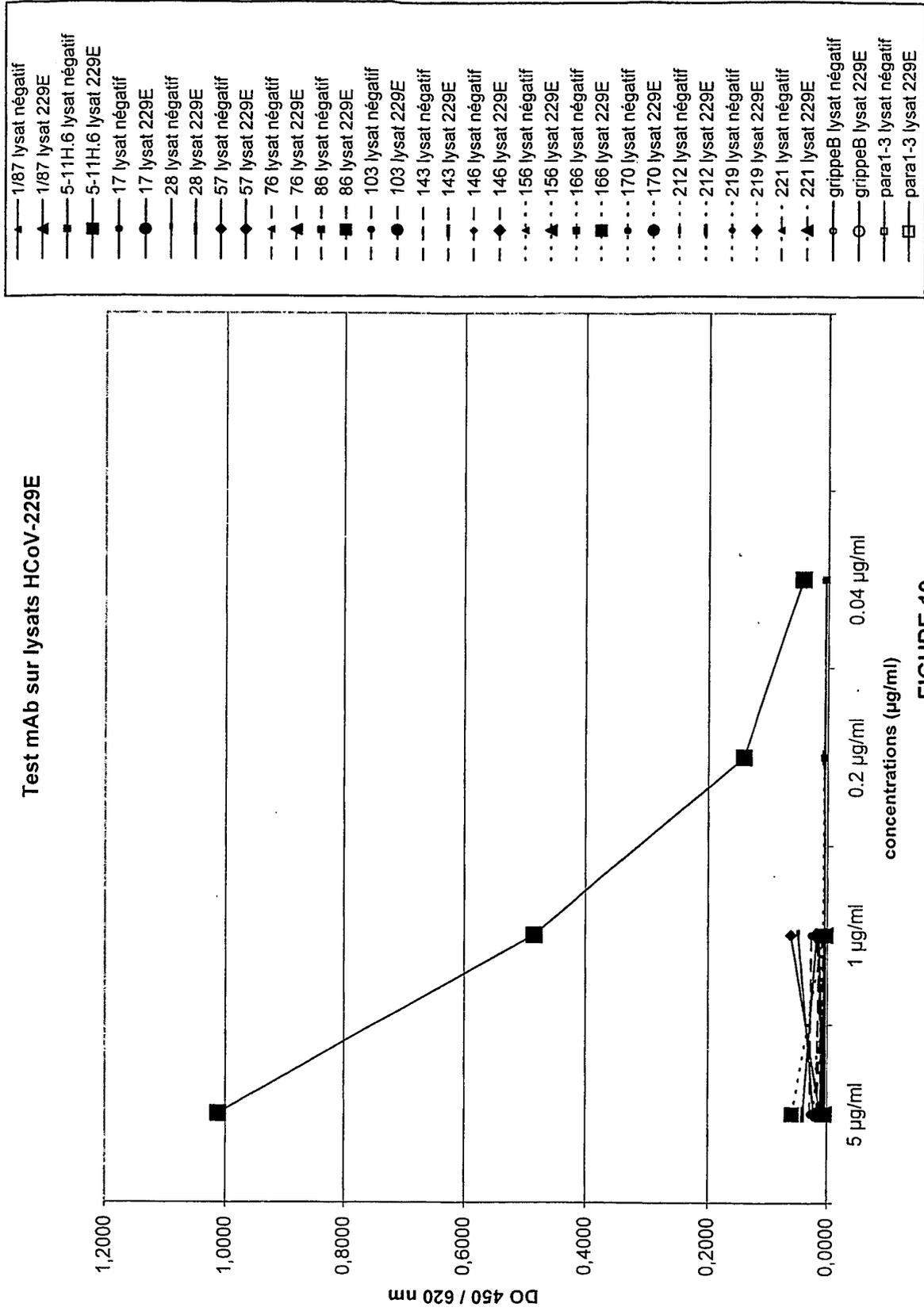


FIGURE 19

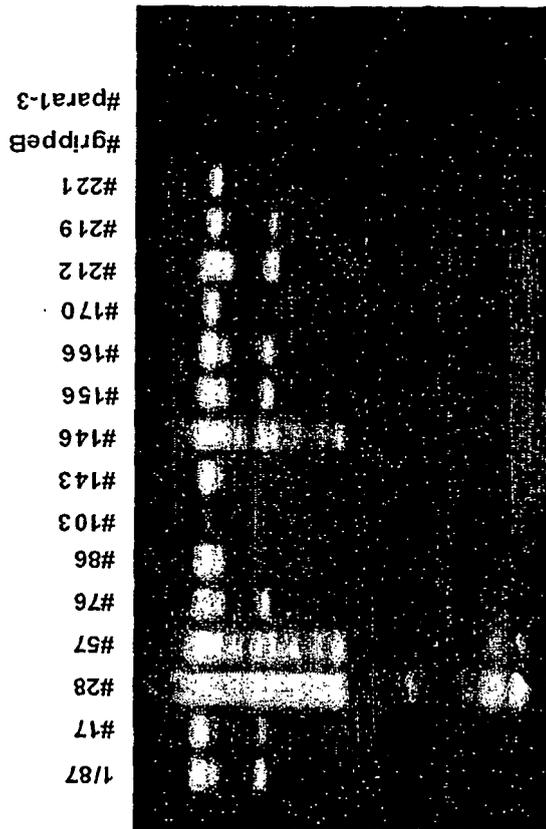


FIGURE 20

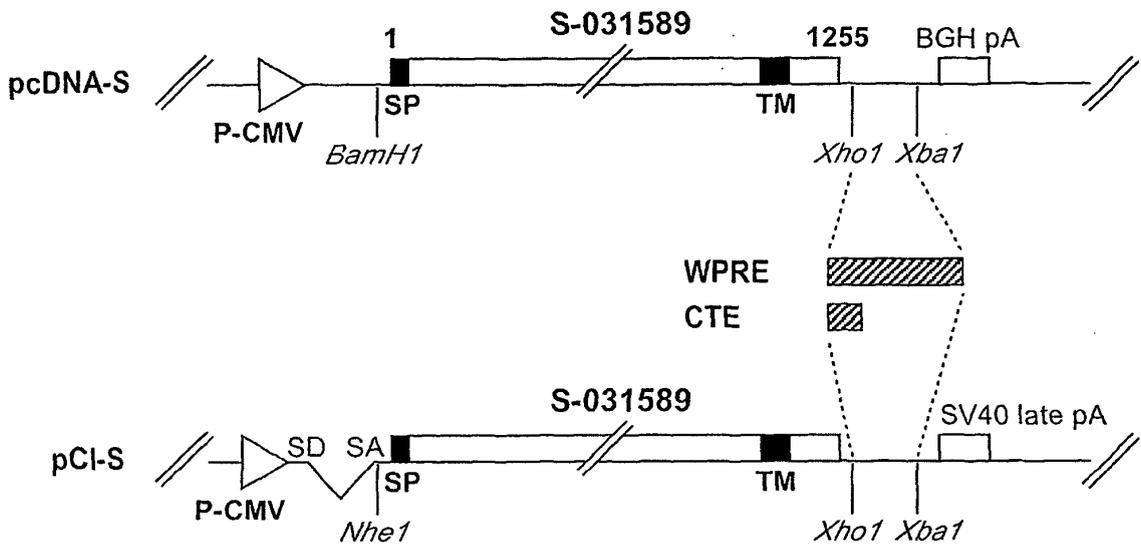


FIGURE 21

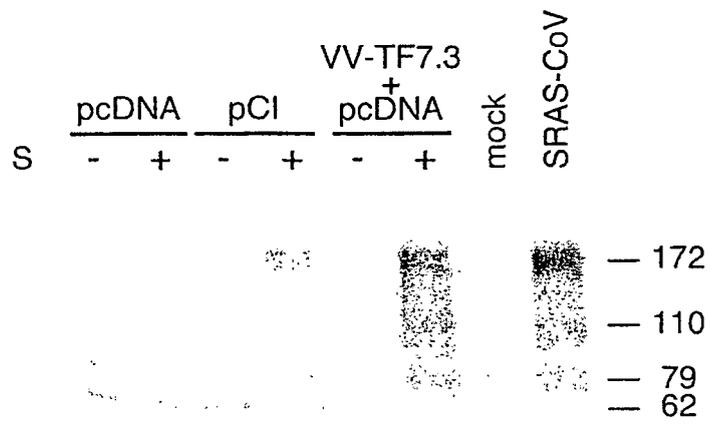
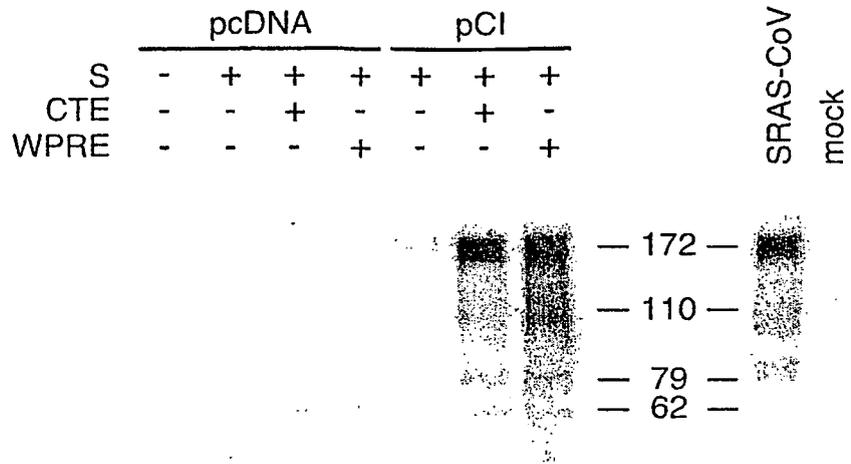


FIGURE 22

A.



B.

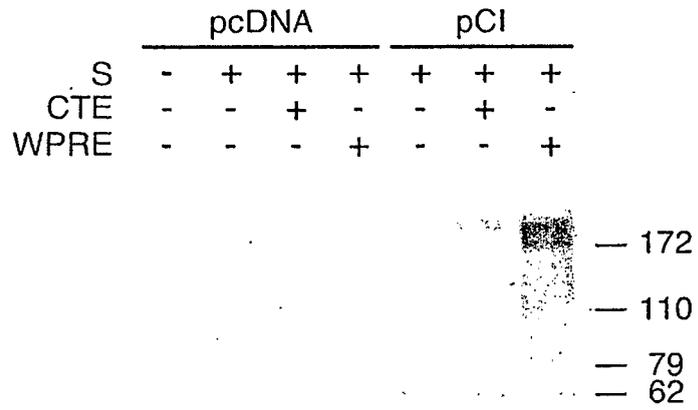


FIGURE 23

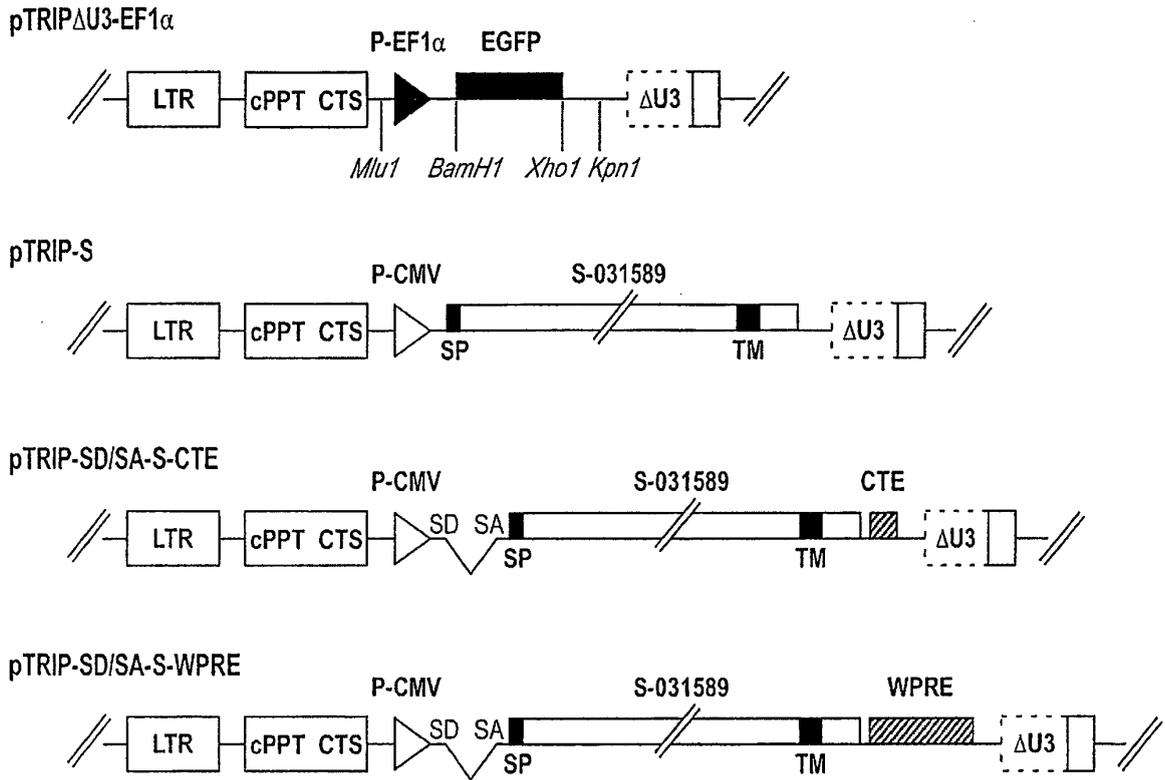


FIGURE 24

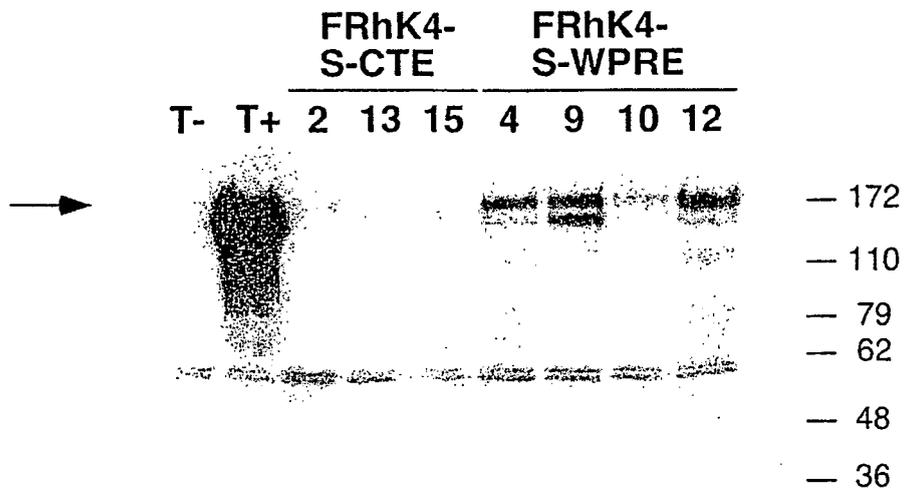


FIGURE 25

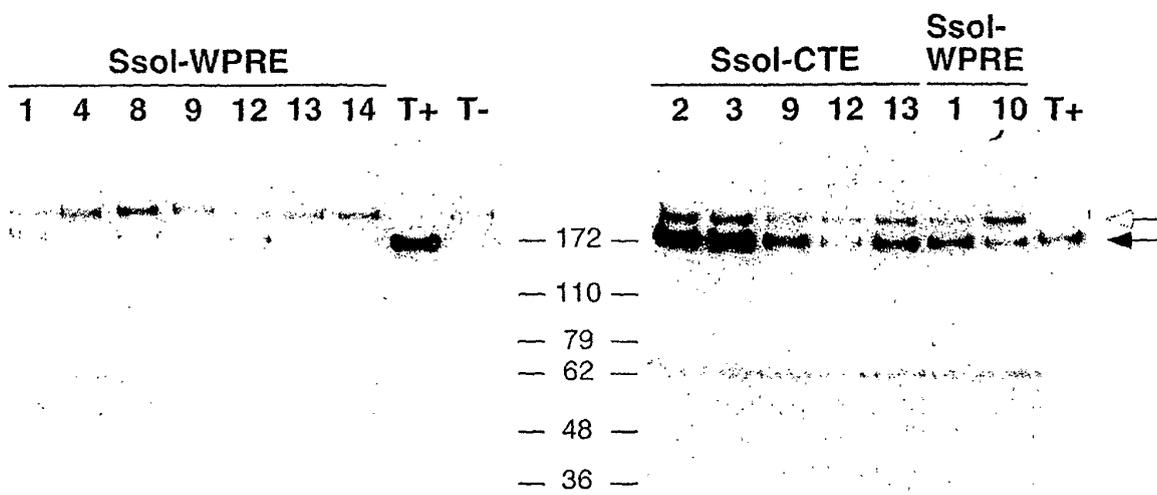
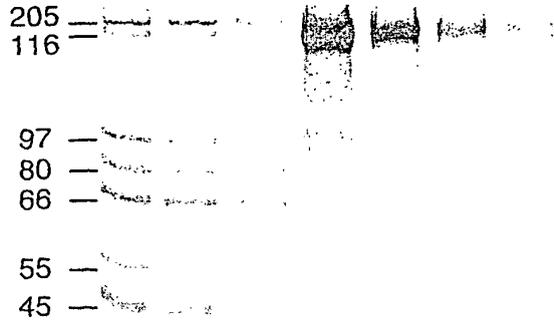


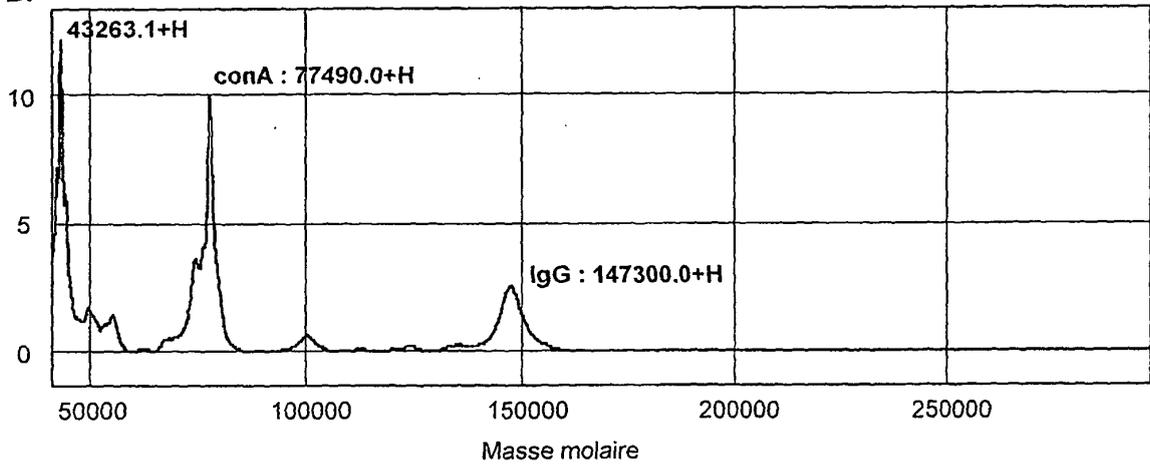
FIGURE 26

A.

MM (ng)			Ssol (μ g)		
120	60	30	2	.5	.13 .03



B.



C.

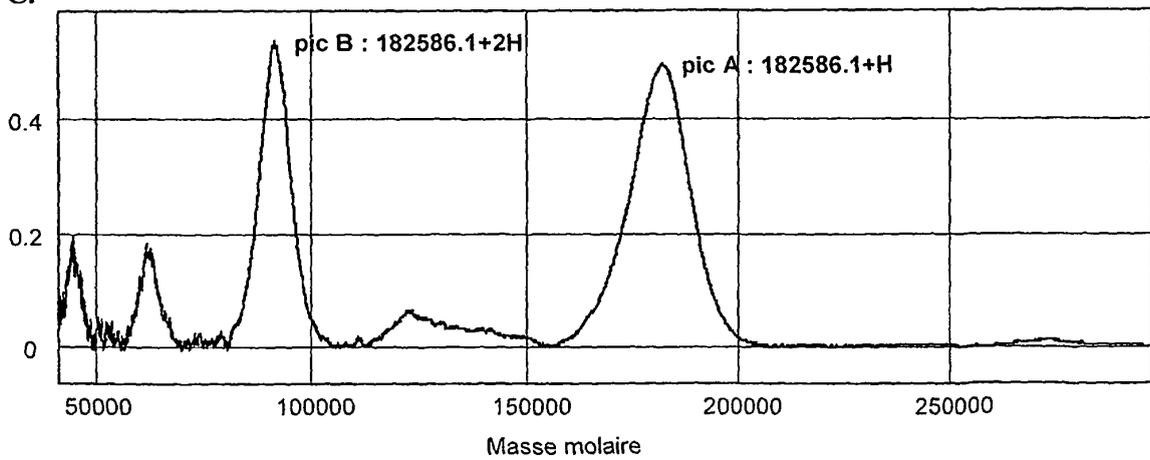


FIGURE 27 A-C

D.

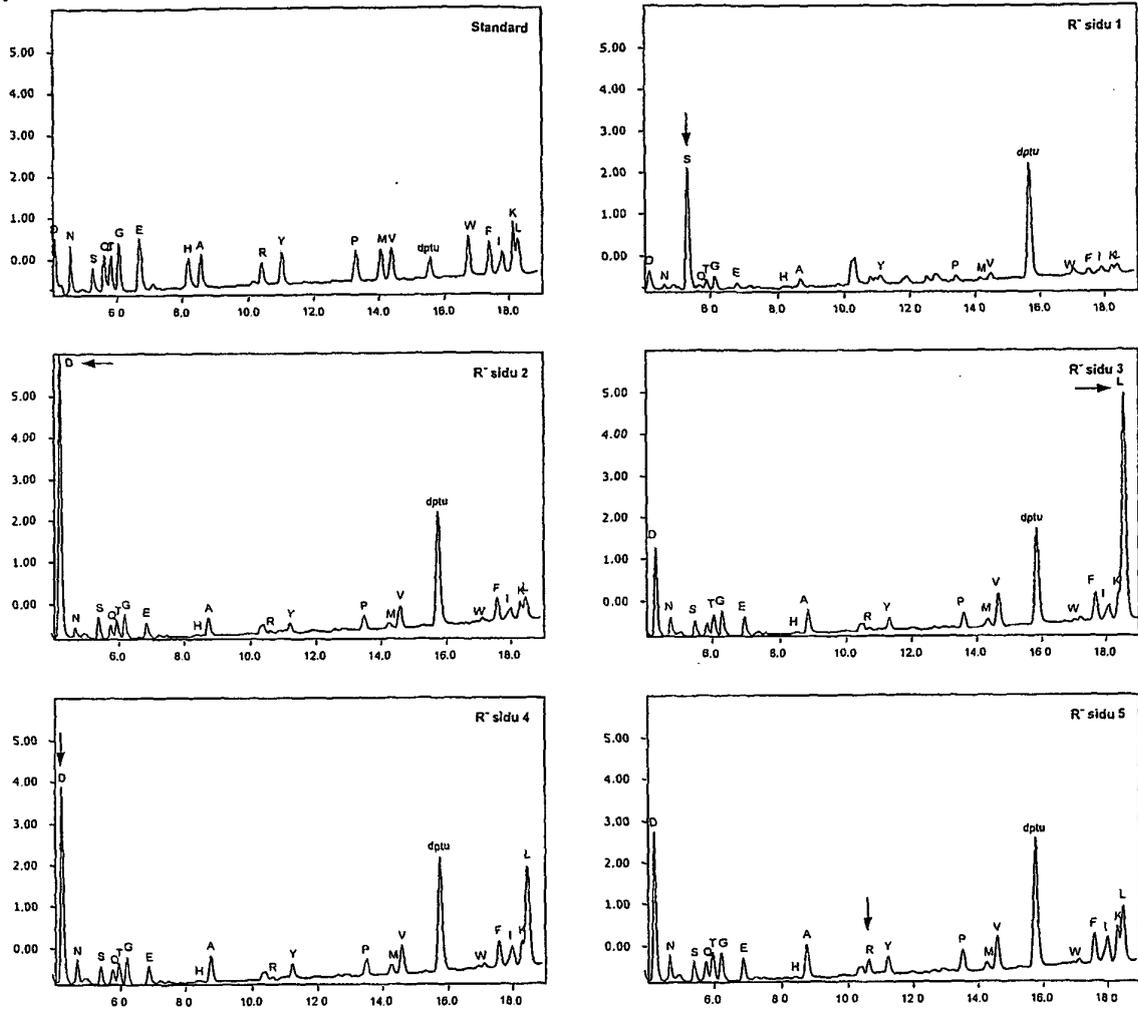
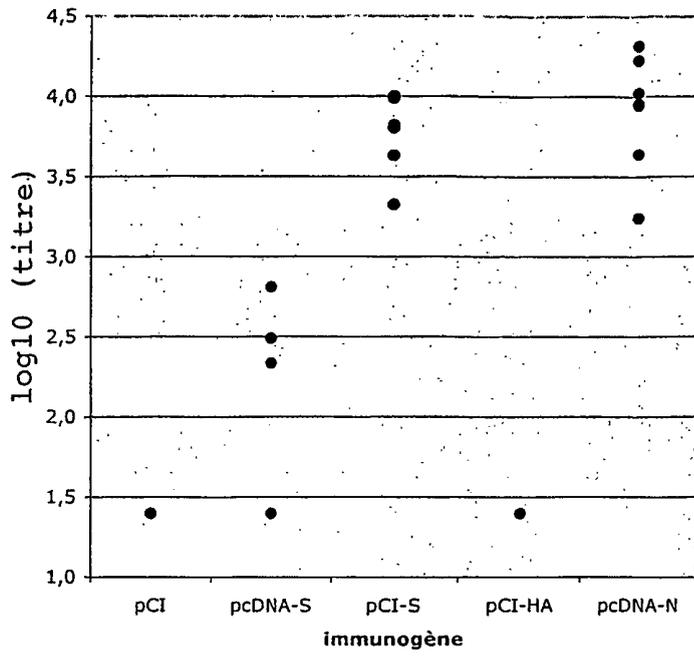


FIGURE 27 D

A.



B.

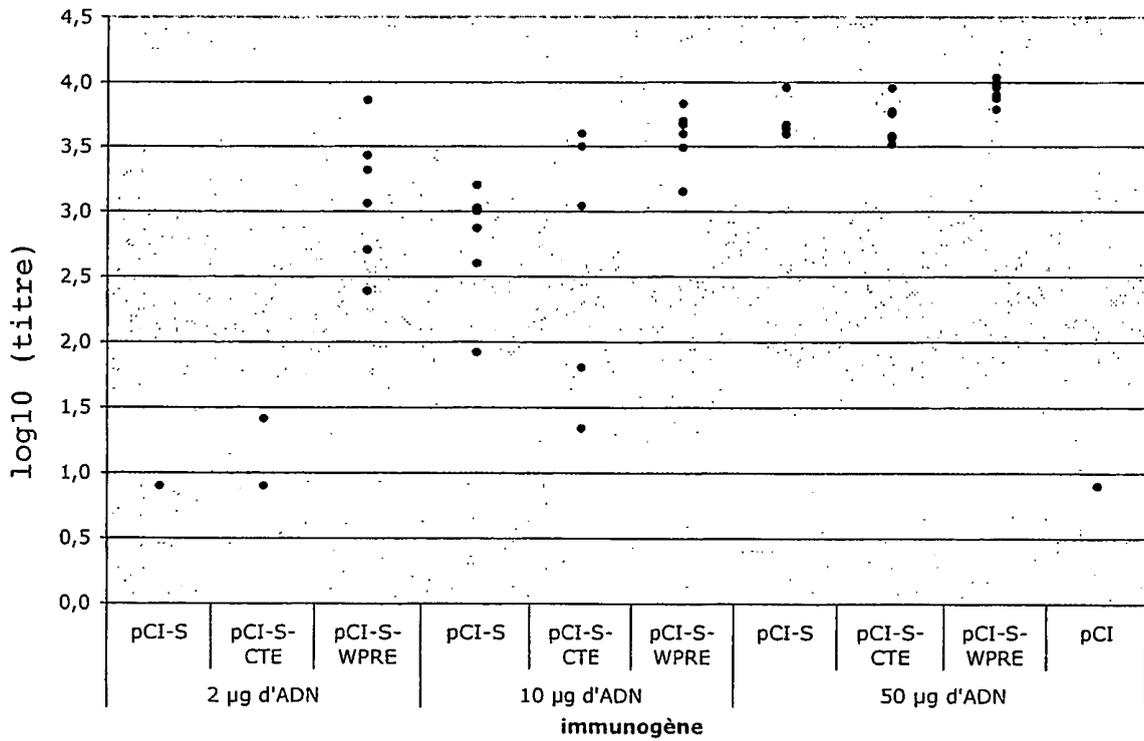
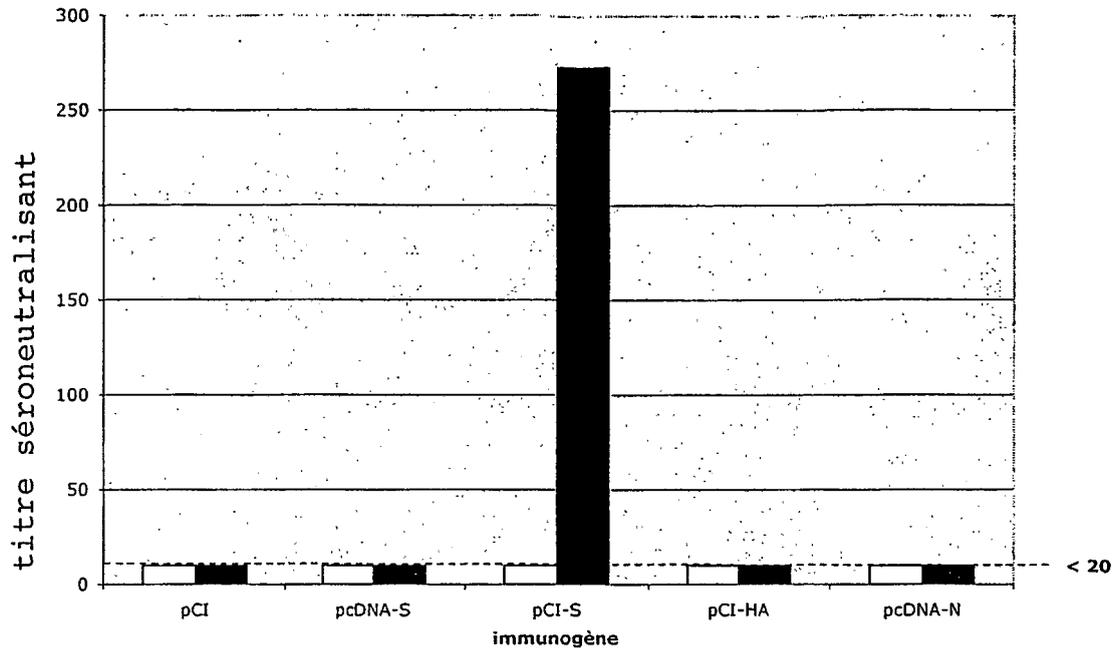


FIGURE 28

A.



B.

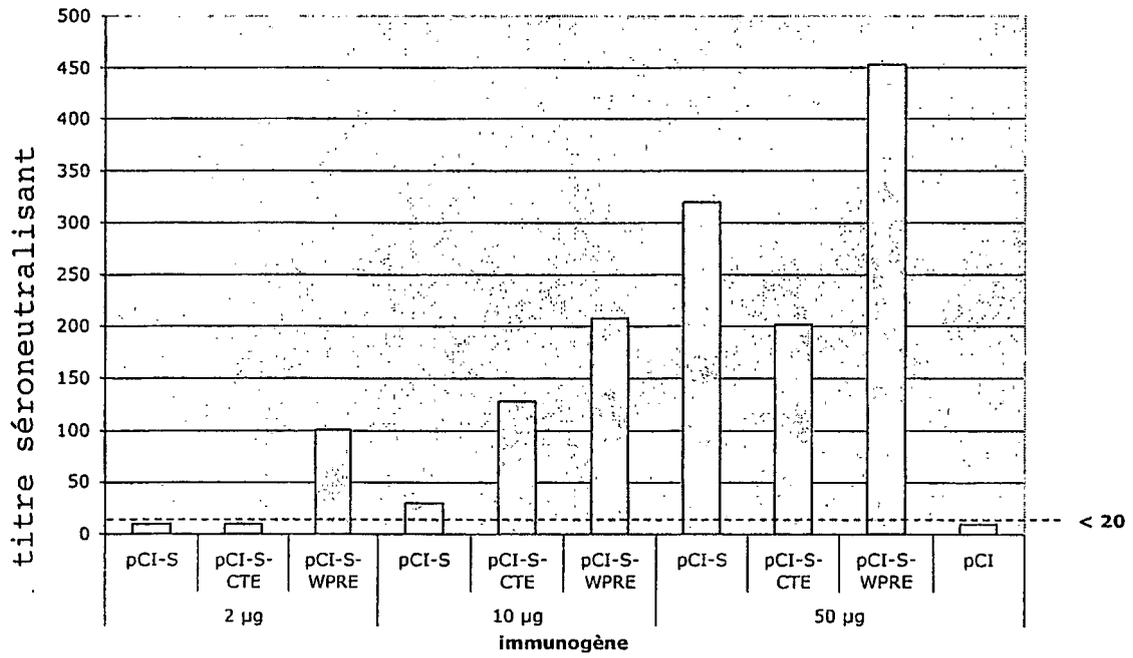


FIGURE 29

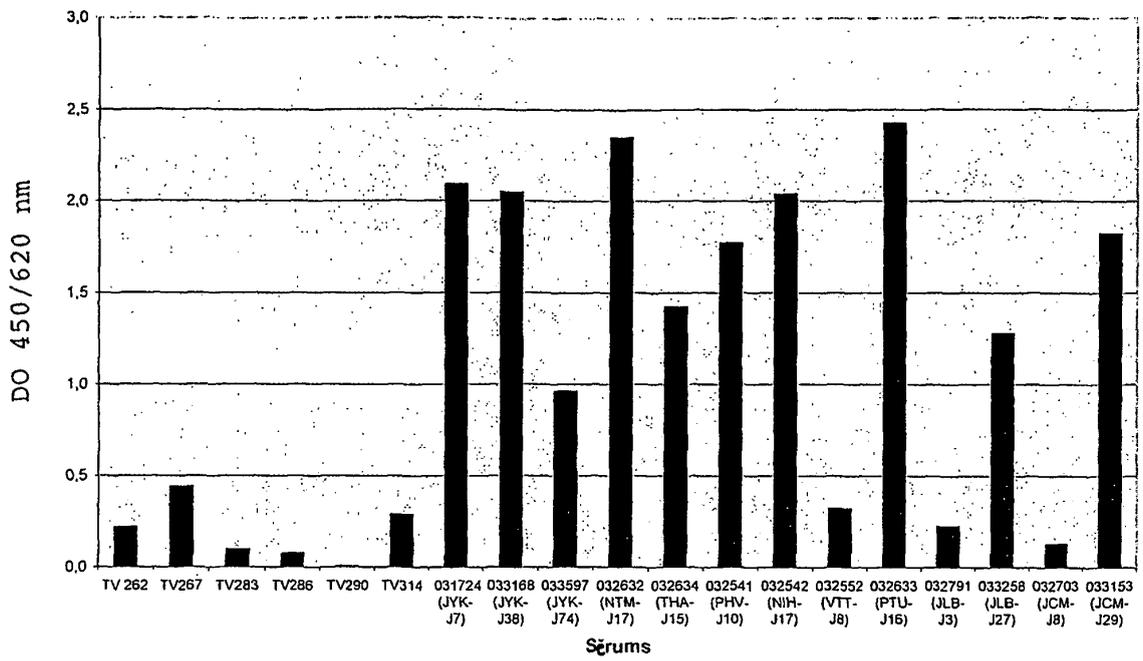


FIGURE 30

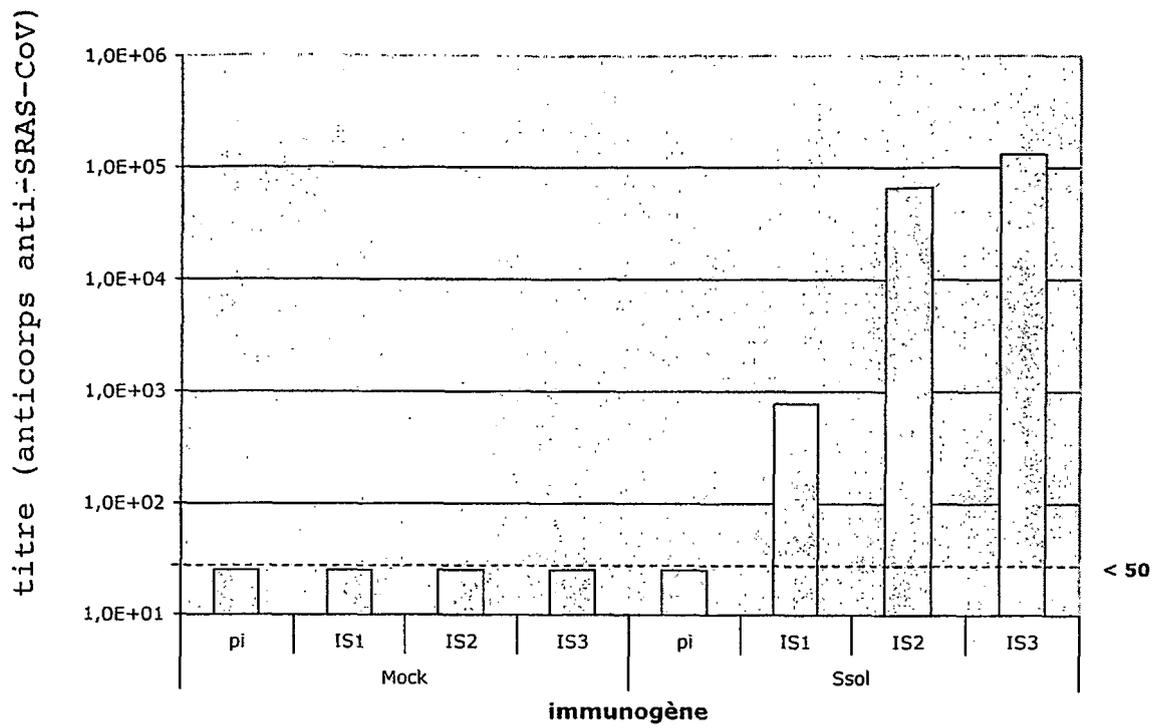


FIGURE 31

EP 1 694 829 B1

I-3059 2697 GGTGCTGGCGCTGCTCTTCAAATACCTTTTGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGC
S-040530 2620 "A"C"A"C"C"G"G"C"C"C"C"G"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"

I-3059 2757 ATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAAC
S-040530 2680 "C"C"G"C"C"G"C"G"G"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"

I-3059 2817 AAGGCGATTAGTCAAATCAAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTG
S-040530 2740 "C"C"C"C"G"C"G"GAGC"G"C"C"C"CAGC"C"CC"C"C"C"

I-3059 2877 CAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT
S-040530 2800 "G"C"C"G"C"

I-3059 2937 AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAG
S-040530 2860 "C"C"C"C"C"CAGTC"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"

I-3059 2997 GCGGAGGTACAAATTGACAGGCTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTA
S-040530 2920 "C"A"G"G"C"C"C"C"C"G"C"C"AC"C"G"GTG"C"G"G"C"C"

I-3059 3057 ACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAA
S-040530 2980 "C"G"G"G"G"C"A"C"C"G"C"C"C"CAGC"C"C"C"C"C"C"

I-3059 3117 ATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCAC
S-040530 3040 "AGC"C"C"G"G"C"GAGC"G"C"C"G"C"C"C"C"C"C"TT"

I-3059 3177 CTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTCTTCTACATGTCACGTATGTG
S-040530 3100 "G"AG"C"C"G"C"C"C"C"C"C"G"G"C"C"G"C"G"C"C"

I-3059 3237 CCATCCCAGGAGAGGAACTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAAGCATA
S-040530 3160 "TAG"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"G"C"C"

I-3059 3297 TTCCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTATTACACAGAGGAAC
S-040530 3220 "C"C"G"G"C"G"C"C"C"C"C"C"C"CAGC"C"C"C"C"C"

I-3059 3357 TTCTTTTCTCCACAAATAATTACTACAGACAATACATTTGTCTCAGGAAATGTGATGTC
S-040530 3280 "CAGC"C"G"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"

I-3059 3417 GTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTTGACTCATT
S-040530 3340 "G"C"C"C"C"C"TT"C"G"C"C"C"C"C"C"C"C"G"C"C"G"AGC"

I-3059 3477 AAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAATCACCAGATGTTGATCTTGGCGAC
S-040530 3400 "G"G"C"C"C"C"A"C"C"C"C"C"C"C"C"C"G"C"G"TT

I-3059 3537 ATTTAGGCATTAACGCTTCTGTCGTCACATTCAAAAGAAATGACCGCCTCAATGAG
S-040530 3460 "CAGC"C"C"C"C"G"G"C"C"G"G"C"C"A"A"G"C"A

I-3059 3597 GTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATGGGAAAATATGAGCAA
S-040530 3520 "G"C"G"CC"G"C"GAGC"G"C"C"C"C"C"G"GC"C"G"C"

I-3059 3657 TATATTAATGGCCTTGGTATGTTGGCTCGGCTTCAATGCTGGACTAATGCCATCGTC
S-040530 3580 "C"C"G"C"C"C"C"G"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"

I-3059 3717 ATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGC
S-040530 3640 "G"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"C"TC"C"C"G"AC"C"

I-3059 3777 TCTTGTGTTCTTGTGCAAGTTTGTATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGT
S-040530 3700 AGC"C"CAGC"C"C"C"C"AGC"C"G"GC"C"

I-3059 3837 AAATTACATTACATAAACGAACCTTATGATTTGTTTATGAGATTTTACTCTTGGAT
S-040530 3760 "GC"G"C"C"C"G"TT"CGA"

I-3059 3897 CAATTACTGCACAGCCAGTAAAAATTGACAATGCTTCTCCTGCAAGT

FIGURE 32.3

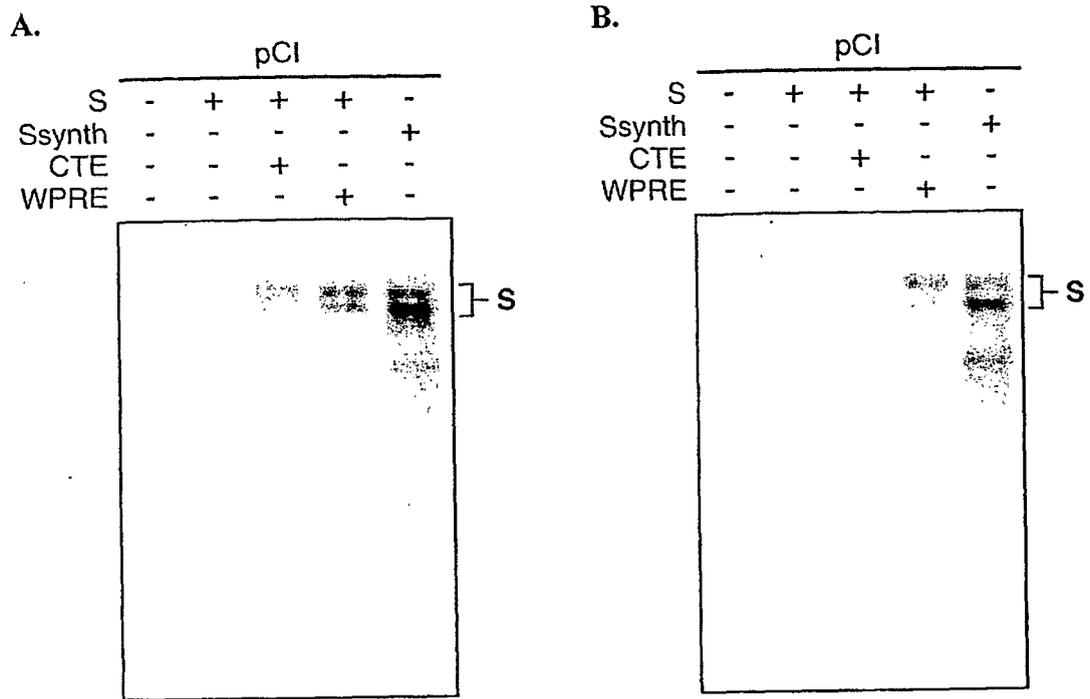
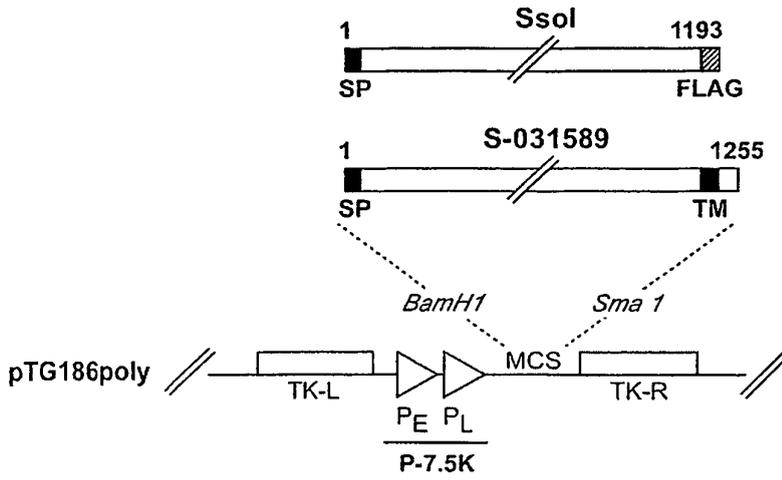
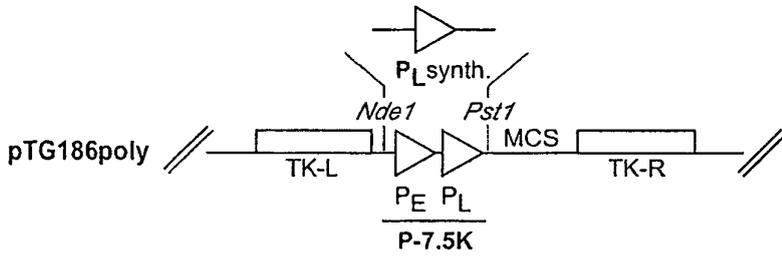


FIGURE 33

A.



B.



C.

CATATG AGC [T]₂₀GGCATATAAATA GACTC GGCGCGCC AT CTGCAG
*Nde*I promoteur 480 *Asc*I *Pst*I

FIGURE 34 A-C

D.

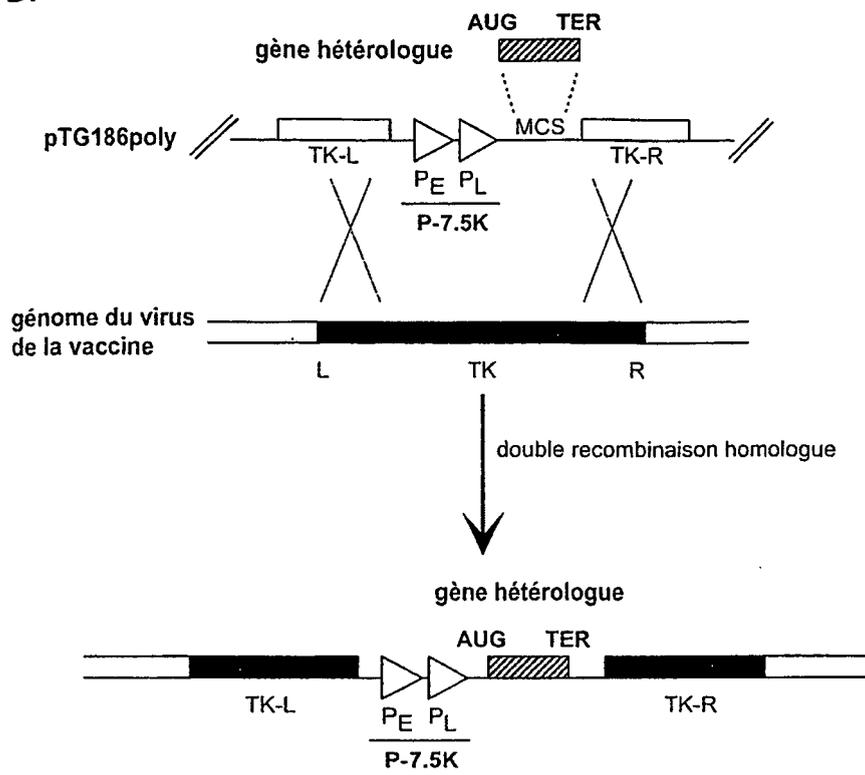
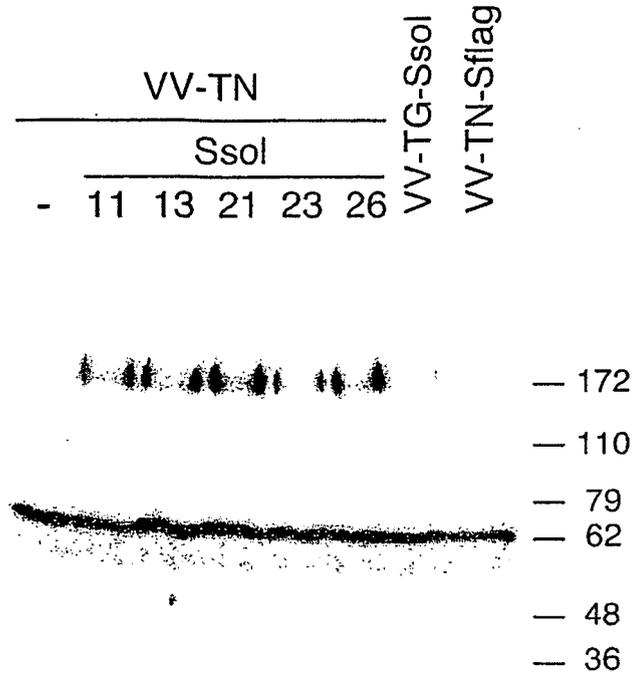


FIGURE 34 D

A.



B.

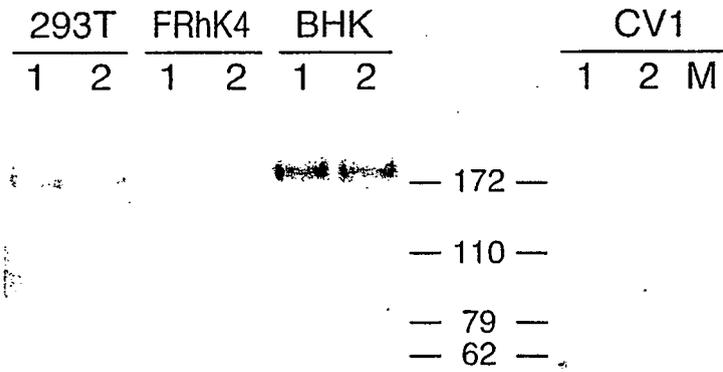


FIGURE 36

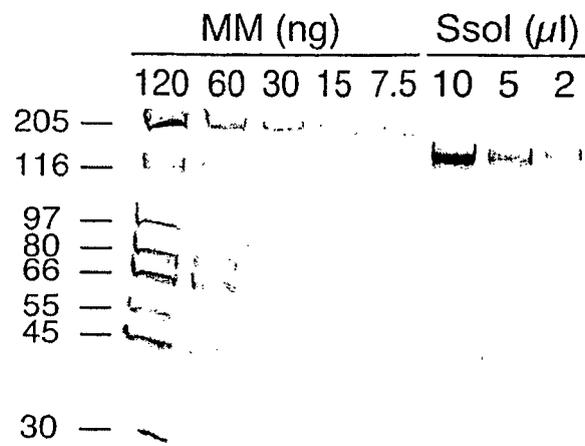


FIGURE 37

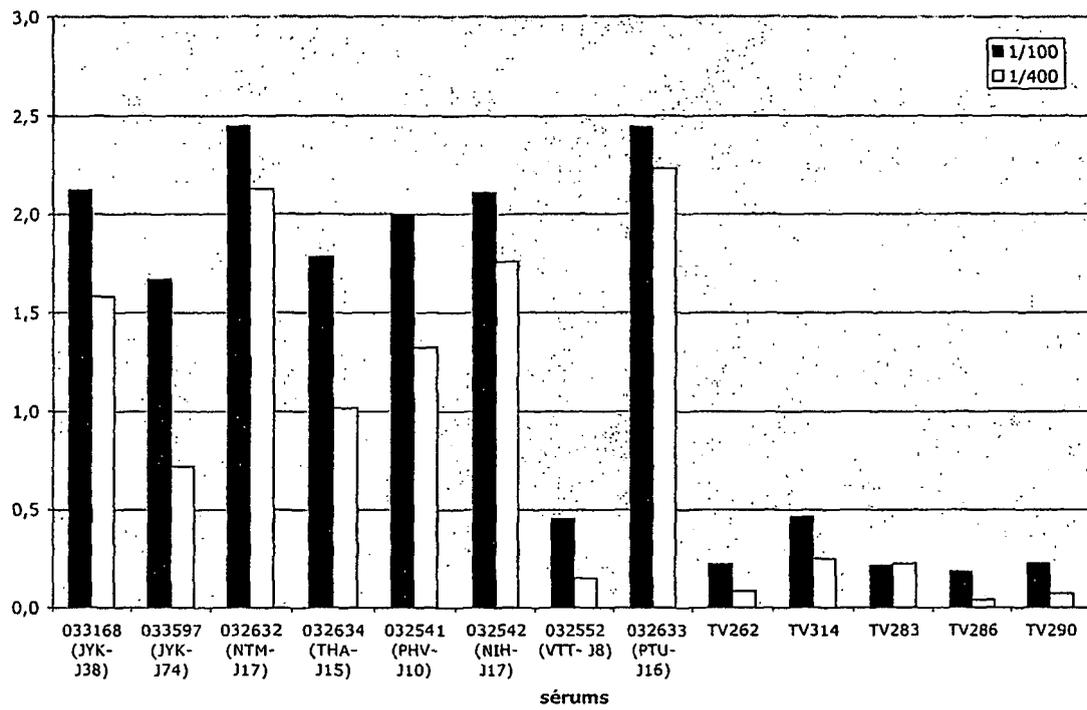
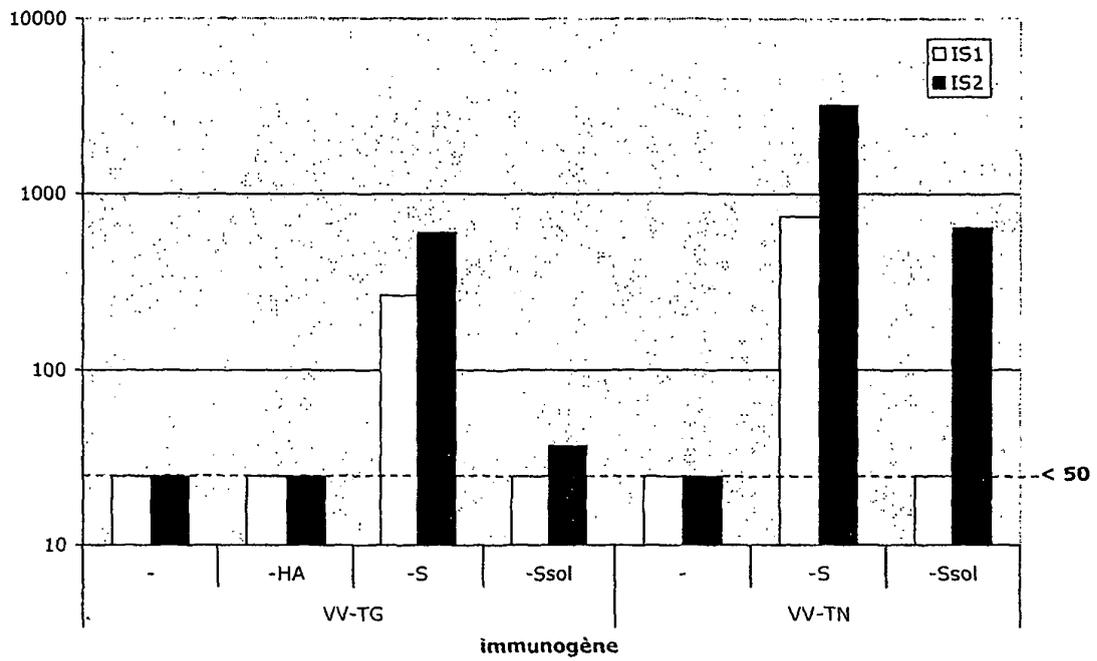


FIGURE 38

A.



B.

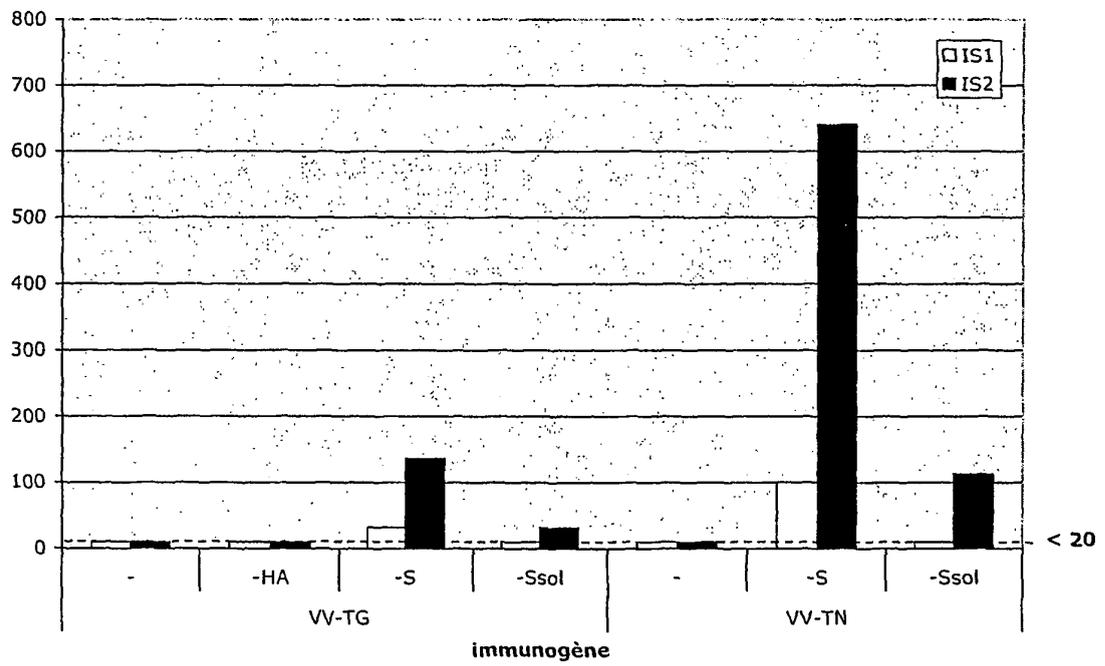


FIGURE 39

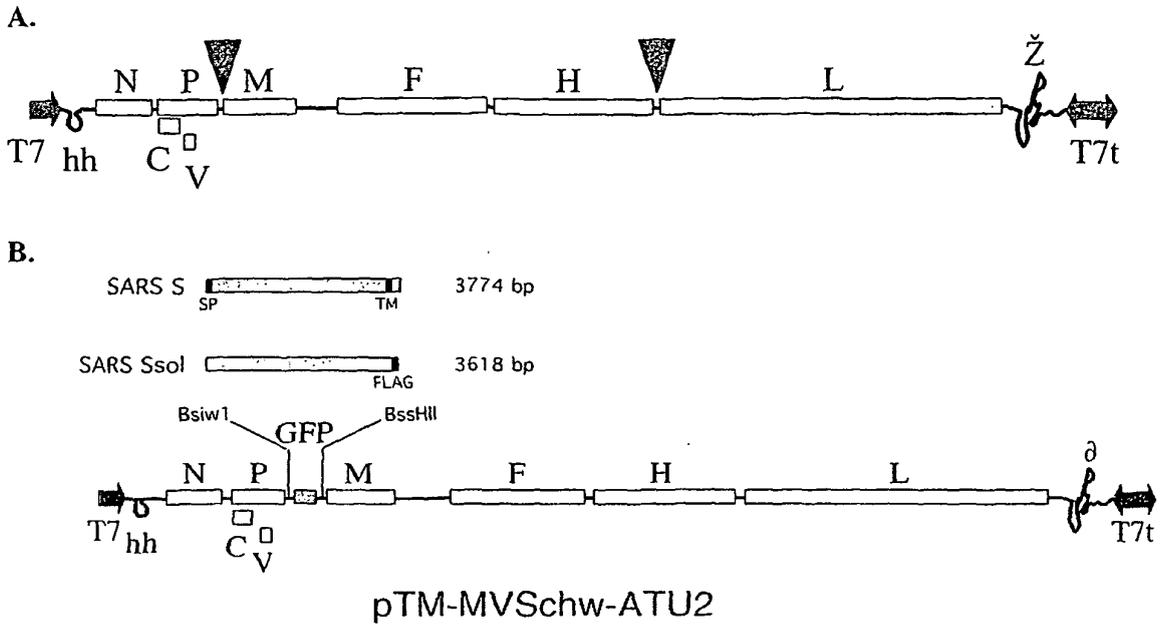


FIGURE 40

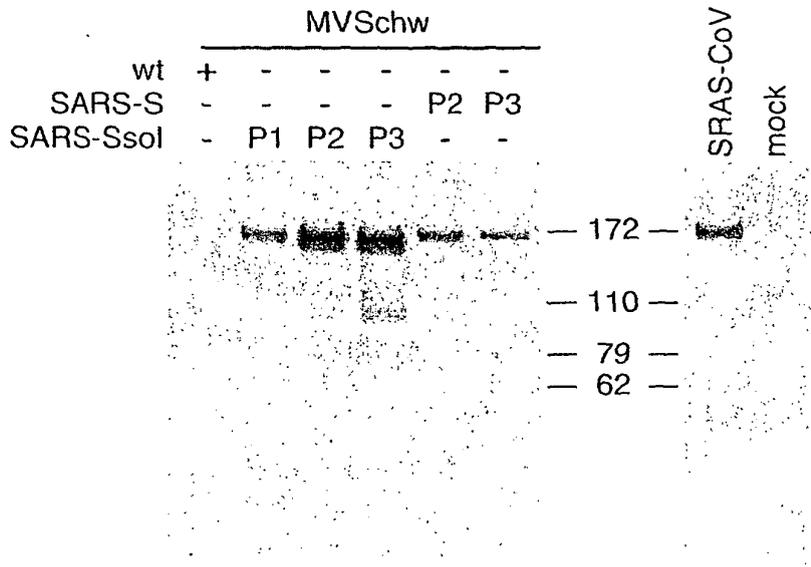


FIGURE 41

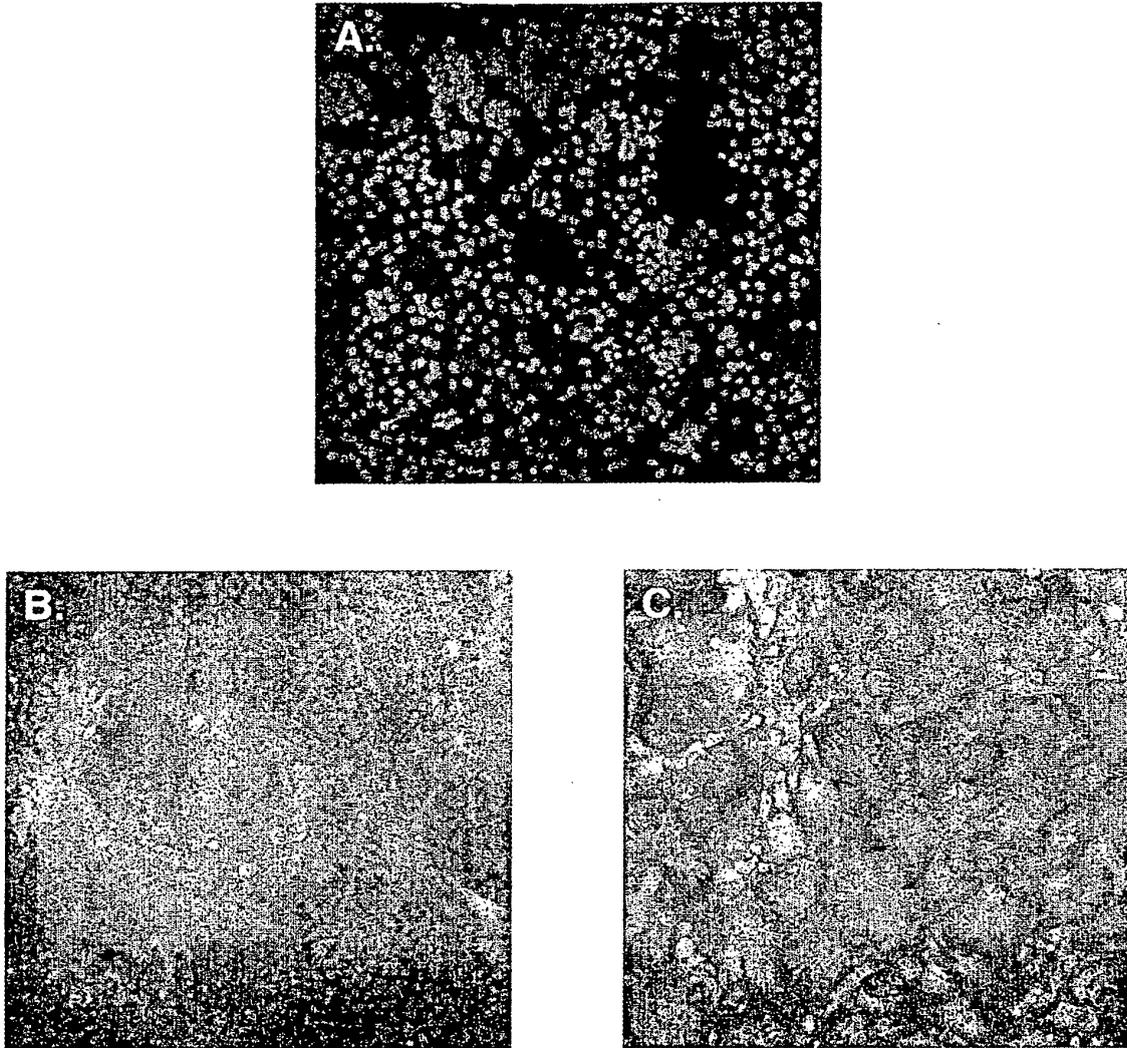


FIGURE 42

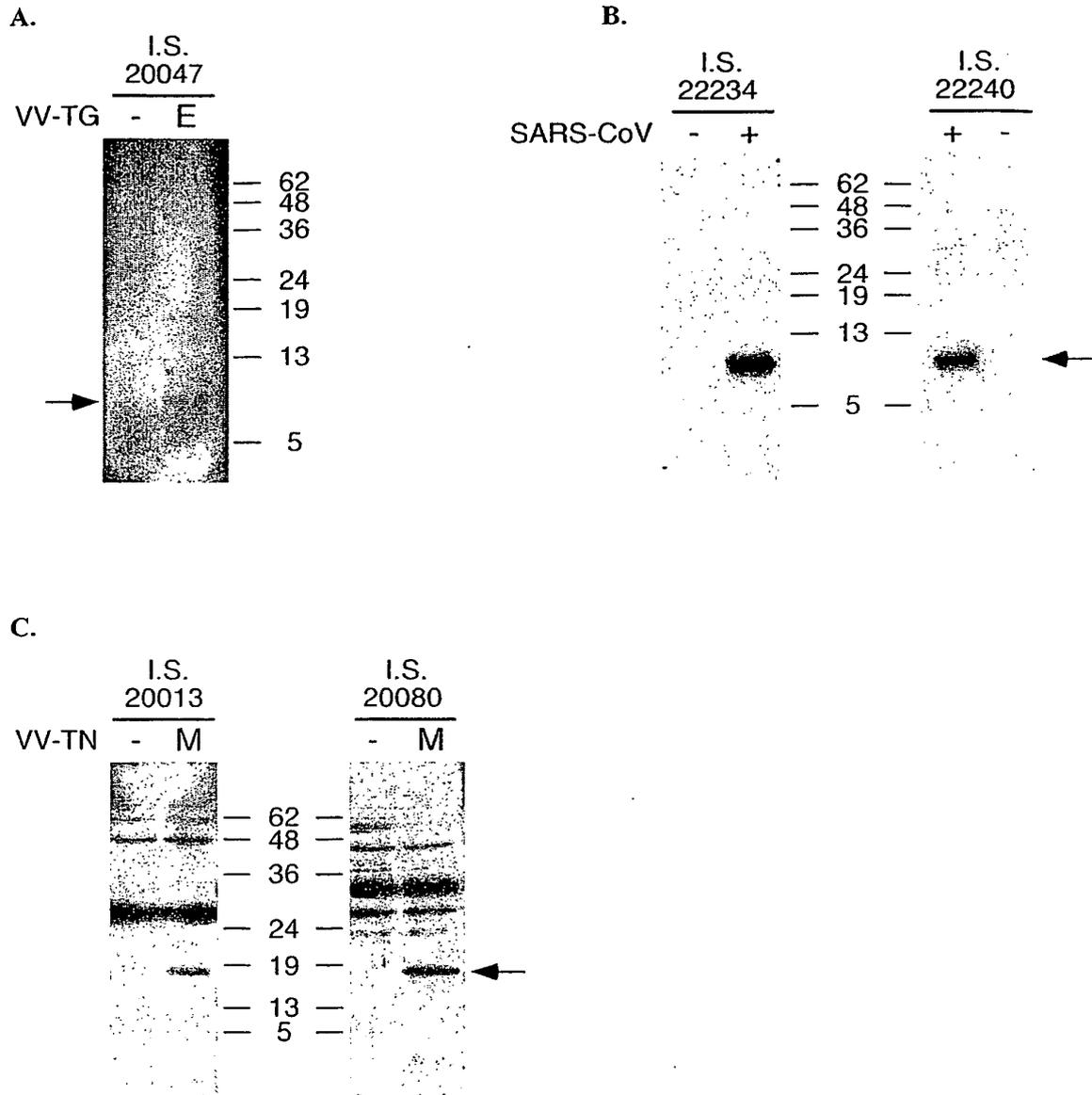


FIGURE 43

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- US 4816567 A [0097]
- WO 9845332 A [0098]
- EP 02291551 A [0402]
- EP 02291550 A [0402]
- FR 0314152 [0417]
- FR 0314151 [0417]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **T.G.KSIAZEK et al.** *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 348, 1319-1330 [0013]
- **C. DROSTEN et al.** *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 348, 1967-1976 [0013]
- **Peiris et al.** *Lancet*, 2003, vol. 361, 1319 [0013]
- **A. MARRA et al.** *Science*, 01 Mai 2003, vol. 300, 1399-1404 [0014]
- **A. ROTA et al.** *Science*, 2003, vol. 300, 1394-1399 [0014]
- **Holmes.** *J.C.I.*, 2003, vol. 111, 1605-1609 [0017]
- **Frederick M. AUSUBEL.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Son Inc., Library of Congress, 2000 [0094]
- **John E. Cologan.** *Current Protocols in Immunology*. Wiley and Son Inc. Library of Congress, 2000 [0094]
- **E. Howell ; D Lane.** *Antibodies : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0094]
- **Köhler ; Milstein.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0097]
- **Winter ; Milstein.** *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0099]
- **Sizun et al.** *J. Virol. Met.*, 1998, vol. 72, 145-152 [0147]
- **Nielsen et al.** *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0147] [0337]
- **Sonnhammer et al.** *Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, 1998, 175-182 [0147]
- **Sirven et al.** *Mol. Ther.*, 2001, vol. 3, 438-448 [0147] [0327] [0328]
- **Combredet.** *Journal of Virology*, 2003, vol. 77, 11546-11554 [0147] [0403]
- **Krogh et al.** *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 305 (3), 567-580 [0239]
- **von Heijne.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 225, 487-494 [0239]
- **Zhou ; Zhou.** *Protein Science*, 2003, vol. 12, 1547-1555 [0239]
- **Nalcane P.K. ; Kawaoi A.** Peroxydase-labeled antibody, a new method of conjugation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1974, vol. 22 (23), 1084-1091 [0263]
- **Nakane et al.** *J. of Histo and cytochemistry*, 1974, vol. 22, 1084-1091 [0305]
- **Sirven.** *Mol. Ther.*, 2001, vol. 3, 438-448 [0321]
- **Zennou et al.** *Cell*, 2000, vol. 101, 173-185 [0327] [0328]
- **Zennou.** *Cell*, 2000, vol. 101, 173-185 [0334]
- **Yang.** *Nature*, 2004, vol. 428, 561-564 [0354]
- **Buchholz.** *PNAS*, 2004, vol. 101, 9804-9809 [0354]
- **Kieny.** *Biotechnology*, 1986, vol. 4, 790-795 [0377]
- **Kieny.** *Nature*, 1984, vol. 312, 163-166 [0379]
- **Hilleman.** *Vaccine*, 2002, vol. 20, 651-665 [0399]
- **Combredet.** *J. Virol.*, 2003, vol. 77, 11546-11554 [0399] [0402]
- **Calain ; Roux.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4822-4830 [0404]
- **Schneider et al.** *Virology*, 1997, vol. 227, 314-322 [0404]
- **Radecke.** *Embo J.*, 1995, vol. 14, 5773-5784 [0407]
- **Parks.** *J. Virol.*, 1999, vol. 73, 3560-3566 [0407]