

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-390**
(22) Přihlášeno: **15.07.1997**
(30) Právo přednosti: **19.07.1996 FR 9609400**
(40) Zveřejněno: **12.05.1999**
(Věstník č. 5/1999)
(47) Uděleno: **17.12.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **27.01.2010**
(Věstník č. 4/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/FR1997/001314**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/003198**

(11) Číslo dokumentu:

301 365

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/27 (2006.01)
A61K 39/193 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/38 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 95/20660; WO 93/19183; EP 0304786; WO 86/07593; EP 0936922.

(73) Majitel patentu:
MERIAL, F-69002 Lyon, FR
(72) Původce:
Audonnet Jean-Christophe, Lyon, FR
Bouchardon Annabelle, Lyon, FR
Riviere Michel, Ecully, FR
(74) Zástupce:
TRAPLOVÁ HAKR KUBÁT Advokátní a patentová
kancelář, Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
Imunogenní kompozice pro vyvolání u savce
čeledi koňovitých imunologické odezvy proti
viru rinopneumonitidy, použití této kompozice
pro výrobu léčiva a souprava obsahující tuto
kompozici

(57) Anotace:
Imunogenní kompozice pro vyvolání u savce čeledi koňovitých imunologické odezvy proti viru rinopneumonitidy savců čeledi koňovitých (EHV), která obsahuje alespoň jeden plasmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nebo molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci nebo sekvence kódující EHV gB, gD nebo gB a gD, a farmaceuticky přijatelný nosič. Použití této kompozice pro výrobu léčiva pro vyvolání imunologické odezvy u savce čeledi koňovitých, a souprava, která obsahuje (i) výše definovanou imunogenní kompozici a (ii) koňskou vakcínu zvolenou ze souboru zahrnujícího celou živou vakcínu, inaktivovanou celou vakcínu, podjednotkovou vakcínu a rekombinantní vakcínu.

CZ 301365 B6

Imunogenní kompozice pro vyvolání u savce čeledi koňovitých imunologické odezvy proti viru rinopneumonitidy, použití této kompozice pro výrobu léčiva a souprava obsahující tuto kompozici

5

Oblast techniky

Vynález se týká imunogenní kompozice pro vyvolání u savce čeledi koňovitých imunologické odezvy proti viru rinopneumonitidy, použití této kompozice pro výrobu léčiva a soupravy obsahující tuto kompozici.

10

Dosavadní stav techniky

Patologie koní představuje dosti velkou rozmanitost. Vedle dobře známých dýchacích nemocí, jako je rhinopneumonie a chřipka, jsou koně náchylní, zejména na americkém kontinentě, na různé encefalitidy. Konečně trpí koně také různými jinými chorobami, mezi nimiž lze citovat zejména tetanus, lymfatické onemocnění, zánět tepny koní a v neposlední řadě virus vztekliny.

15

Podmínky vystavení koní různým patogenním mikroorganismům jsou znásobeny četným převážením koní na velké vzdálenosti po zemi nebo vzduchem, takže riziko nákazy má stoupající tendenci.

20

Nebo, vezme-li se v úvahu vysoká cena těchto zvířat zejména reproduktivních, jízdních a závodních koní, je z ekonomického hlediska významné kontrolovat co nejvíce rizika nákazy, která vedou k jejich dlouhodobé indispozici nebo ztrátě. Už existuje určité množství vakcín, jejichž účinnost je proměnlivá.

25

Na rhinopneumonii lichokopytníků, vyvolanou různými kmeny viru koňského oparu (EHV), byly vyvinuty zaktivované podjednotkové vakcíny, které všechny představují určité množství omezení projevující se neúplnou ochranou krátkého trvání a případně problémy škodnosti souvisejícími s použitými pomocnými látkami.

30

Koňská chřipka představuje také významné onemocnění, kterému se hodlá bránit vakcinací. Používanými vakcínami jsou vakcíny inaktivované nebo pod jednotkové, které představují určitou účinnost avšak nejsou nicméně bez problémů, často není ochrana úplná a má zpravidla poměrně krátké trvání, vyžadující jako v případě rhinopneumonie revakcinaci. Jsou také problémy se škodlivostí vakcín.

35

Zavedeny jsou vakcíny na základě protitetanového anatoxinu a představují nepopíratelnou účinnost.

40

Existují také vakcíny proti encefalitidám, encefalitidě západní, východní a venezuelské, jejichž účinnost je rovněž málo známa.

45

Z důvodů jednak ekonomických, jednak racionálnosti koňských vakcín byly už navrženy formulace vícečetných vakcín k prevenci vůči několika těmto nakažlivým nemocem.

Dosud vyvinuté úsilí se týkalo neaktivovaných vakcín nebo živých vakcín, případně směsí těchto vakcín. Jejich zavedení naráží na problémy vztahu účinnosti a stability. Ve skutečnosti jde o zajištění vztahu mezi různou účinností vakcín se zřetelem na různé použité antigeny nebo se zřetelem na samotné formulace jmenovitě v případech, kde se kombinují neaktivované vakcíny s živými vakcínami. Je také zřejmý problém konzervace takových kombinovaných vakcín a rovněž problém jejich neškodnosti zejména ve spojení s pomocnými prostředky. Obecně jsou takové vakcíny velmi drahé.

50

55

Tyto formulace ostatně neumožnily spojit tři hlavní účinky, totiž účinek na koňskou chřipku, rhinopneumonii, zejména RHV-1 a EHV-4 a tetanus. Bylo známo například spojení účinků na chřipku a encefalitidu, nebo rhinopneumonii a encefalitidu.

Podle patentových spisů číslo WO-A 90/1 1092, WO-A 93/1 9 1 83, WO-A 94/21797 a WO-A 95/20660 se používá nedávno vyvinuté techniky polynukleotidních vakcín. Tvrdí se, že vakcíny používají plazmidu schopného exprese antigenu začleněného do plazmidu v hostitelských buňkách. Navrhují se všechny cesty podávání (například intraperitoneální, intravenosní, intramuskulární, transkutánní, intradermický a sliznicový). Použit lze rovněž různých vakcinačních prostředků, jako DNA uložené na povrchu částic zlata a určené k proniknutí do kůže zvířete (Tang a kol., Nature 356, str. 152 až 154, 1992) a injektaž tekutin umožňujících proniknutí do kůže, svalů, tukových tkání a tkání děložních (Furth a kol. Analytical Biochemistry 205, str. 365 až 368, 1992; viz rovněž patenty US 5 846 946, US 5 620 896, US 5 643 578, US 5 580 589, US 5 589 466, US 5 693 622 a US 5 703 055; Science, 259:1745-49, 1993; Robinson a j., IMMUNOLOGY, 9:271-83, 1997; Luke a j., J. Infect. Dis. 175 (1):91-97, 1997; Norman a j. Vaccine, 15(8):801-803, 1997; Bourne a j., The Journal of Infectious Disease, 173:800-7, 1996).

Polynukleotidové vakcíny mohou vyžít stejně dobře jak DNA jako takové, tak DNA formulované například na bázi liposomů nebo kationických lipidů.

Polynukleotidové vektory, zahrnující geny HA nebo NP, byly zkoumány na virus chřipky (influenza virus) u myší, u fretek a u kuřat. Žádného poznatku nelze použít u koní.

Pokud jde o tetanus, bylo nedávno oznámeno, že imunizace myši exprimujícím plazmidem s fragmentem C vyvolala koncová netoxická C-oblast tetanového toxinu výskyt seroprotekčních protilátek u myší.

Není dosud možno přenášet přímo poznatky výsledků, získaných u zvířat s malou životností, na ostatní savce a zejména na savce velkých postav.

Ochranu lichokopytníků a zejména koní proti infekčnímu onemocnění je tudíž stále potřeba vylepšovat.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je imunogenní kompozice pro vyvolání u savce čeledi koňovitých imunologické odezvy proti viru rinopneumonitidy savců čeledi koňovitých (EHV), jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje alespoň jeden plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nebo molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci nebo sekvence kódující EHV gB, gD nebo gB a gD, a farmaceuticky přijatelný nosič.

Výhodně imunogenní kompozice podle vynálezu obsahuje plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nebo molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci nebo sekvence kódující EHV gB a gD.

Výhodně imunogenní kompozice podle vynálezu obsahuje první plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující EHV gB, a druhý plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující EHV gD.

Výhodně EHV je EHV-1.

Výhodně EHV je EHV-4.

Výhodně molekula nebo molekuly nukleové kyseliny obsahují sekvenci pocházející z EHV-1 a sekvenci pocházející z EHV-4.

5

Předmětem vynálezu je rovněž použití výše definované kompozice pro výrobu léčiva pro vyvolání imunologické odezvy u savce čeledi koňovitých a určeného pro podání následující po podání savci čeledi koňovitých vakcíny zvolené ze souboru zahrnujícího celou živou vakcínu, inaktivovanou celou vakcínu, podjednotkovou vakcínu a rekombinantní vakcínu.

10

Předmětem vynálezu je rovněž použití výše definované kompozice pro výrobu léčiva pro vyvolání imunologické odezvy u savce čeledi koňovitých.

15

Předmětem vynálezu je rovněž souprava, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje (i) výše definovanou imunogenní kompozici a (ii) koňskou vakcínu zvolenou ze souboru zahrnujícího celou živou vakcínu, inaktivovanou celou vakcínu, podjednotkovou vakcínu a rekombinantní vakcínu.

20

Formulace vakcín podle vynálezu se mohou podávat různými způsoby známými obecně k polynukleotidové vakcinaci a pomocí známých technik podávání. Dosud se dává přednost výhradně intramuskulárnímu podávání.

25

Vakcinaci lze také provádět intradermickou cestou pomocí injektoru tekutým nástřikem, s výhodou několika tryskami a zejména pomocí injektoru s injekční hlavicí opatřenou několika otvory nebo tryskami, jmenovitě s 5 až 6 otvory nebo tryskami například přístrojem PIGJET (vyráběný a obchodní produkt společnosti Endoscopic, Laons, Francie).

30

Objem dávky pro takový přístroj se s výhodou redukuje na 0,1 až 0,9 ml, zejména 0,2 až 0,6 ml a nejvýhodněji 0,4 až 0,5 ml, přičemž se objem může podávat v jedné nebo několika, s výhodou 2 aplikacích.

35

Shora uvedené jednoúčinkové vakcíny mohou být použity zejména k přípravě víceúčinkových vakcín podle vynálezu.

Formulace jednoúčinkové vakcíny mohou být využity také ve spojení s vakcínou jiného typu (zcela živou nebo inaktivovanou, nebo inaktivovanou, rekombinantní, podjednotkovou) se zřetělem na shora popsanou vakcínu.

40

Vynález se také týká použití různých plazmidů podle vynálezu k výrobě vakcíny určené k vakcinaci prvně vakcinovaných koní alespoň první klasickou vakcínou (jednoúčinkovou nebo víceúčinkovou) typu dosavadního stavu techniky volenou jmenovitě ze souboru zahrnujícího dřívější živou vakcínu, dřívější inaktivovanou vakcínu podjednotkovou vakcínu, rekombinantní vakcínu, přičemž první vakcína obsahuje nebo může exprimovat alespoň jeden kódovaný antigen alespoň jedním plazmidem nebo alespoň jedním antigenem zajišťujícím křížovou ochranu.

45

Výrazně má polynukleotidová vakcína účinek, který se dá vyjádřit zesílením imunitní odezvy a založení dlouhodobé imunity.

50

Obecně vakcíny první vakcinace mohou být voleny z obchodně dostupných vakcín od výrobců veterinárních vakcín.

55

Při jednom výhodném způsobu podle vynálezu se podává zvířeti napřed účinná dávka vakcíny klasického typu, jmenovitě neaktivované, živé, utlumené nebo rekombinantní, nebo také vakcíny pod jednotkové k zajištění primo-vakcinace a s výhodou s prodlením 2 až 4 týdnů se zajistí podání víceúčinkové nebo monoúčinkové podle vynálezu.

Vynález se týká také vakcinačního kitu obsahujícího vakcínu první vakcinace jak dále popsáno a formulaci vakcíny podle vynálezu pro porovnání. Pojednává také o formulaci vakcíny podle vynálezu doprovázené poznámkou o použití této formulace jako porovnání se shora popsanou primo-vakcinací.

5

Vynález zahrnuje také způsob přípravy formulace vakcíny podle tohoto vynálezu.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení pomocí přiložených obrázků.

10

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 Plazmid pVR1012

15

Obr. 2 Plazmid PAB042

Obr. 3 Plazmid PAB031

Obr. 4 Plazmid pAB013

Obr. 5 Plazmid pAB032

Obr. 6 Plazmid pAB043

20

Obr. 7 Plazmid pAB033

Obr. 8 Sekvence genu HA chřipky lichokopytníků kmen Fontai- nebleau

Obr. 9 Plazmid pAB099

Obr. 10 Plazmid pAB085

Obr. 11 Plazmid pAB084

25

Obr. 12 Plazmid pAB070

Obr. 13 Plazmid pAB017

Obr. 14 Plazmid pAB094

Obr. 15 Plazmid pAB093

Obr. 16 Plazmid pAB096

30

Obr. 17 Plazmid pAB095

Obr. 18 Plazmid pAB098

Obr. 19 Plazmid pAB097

Obr. 20 Plazmid pAB041

35

Seznam sekvencí SEO ID č.

SEQ ID č. 1: oligonukleotid AB013

SEQ ID č. 2: oligonukleotid AB014

SEQ ID č. 3: oligonukleotid AB071

40

SEQ ID č. 4: oligonukleotid AB074

SEQ ID č. 5: oligonukleotid AB030

SEQ ID č. 6: oligonukleotid AB031

SEQ ID č. 7: oligonukleotid AB075

SEQ ID č. 8: oligonukleotid AB076

45

SEQ ID č. 9: oligonukleotid AB015

SEQ ID č. 10: oligonukleotid AB016

SEQ ID č. 11: oligonukleotid AB077

SEQ ID č. 12: oligonukleotid AB078

SEQ ID č. 13: oligonukleotid AB186

50

SEQ ID č. 14: oligonukleotid AB187

SEQ ID č. 15: sekvence genu HA chřipky lichokopytníků (kmen Fontainebleau)

SEQ ID č. 16: oligonukleotid AB156

SEQ ID č. 17: oligonukleotid AB159

SEQ ID č. 18: oligonukleotid AB157

5 SEQ ID č. 19: oligonukleotid AB128

SEQ ID č. 20: oligonukleotid AB129

SEQ ID č. 21: oligonukleotid AB038

SEQ ID č. 22: oligonukleotid AB039

SEQ ID č. 23: oligonukleotid AB176

10 SEQ ID č. 24: oligonukleotid AB177

SEQ ID č. 25: oligonukleotid AB174

SEQ ID č. 26: oligonukleotid AB175

SEQ ID č. 27: oligonukleotid AB180

SEQ ID č. 28: oligonukleotid AB181

15 SEQ ID č. 29: oligonukleotid AB178

SEQ ID č. 30: oligonukleotid AB179

SEQ ID č. 31: oligonukleotid AB184

SEQ ID č. 32: oligonukleotid AB185

SEQ ID č. 33: oligonukleotid AB182

20 SEQ ID č. 34: oligonukleotid AB183

SEQ ID č. 35: oligonukleotid AB011

SEQ ID č. 36: oligonukleotid AB012

25 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

30 Kultivace virů

Viry se pěstují v buněčném systému využitým až do získání cytopathického jevu. Buněčné systémy k použití pro každý virus jsou pracovníkům v oboru dobře známy. Stručně řečeno, buňky citlivé na použitý virus, pěstované v minimálně potřebném prostředí Eagle (prostředí „MEM“) nebo v jiném vhodném prostředí, se očkují studovaným virovým kmenem za použití vícenásobku infekce 1. Infikované buňky se tedy inkubují při teplotě 37 °C po dobu potřebnou k výskytu úplného cytopathického jevu (nejméně 36 hodin).

40 Příklad 2

Kultivace bakterií

45 Tetanus Bakterie se kultivují ve vhodném prostředí a za podmínek dobře známých pracovníkům v oboru k získání bakteriální biomasy postačující k extrakci genetického materiálu. Tato extrakce se provádí technikami popsány v literatuře (J. Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. vydání. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

50 Kmeny *Borrelia burgdorferi* se kultivují ve vhodném prostředí za podmínek dobře známých pracovníkům v oboru. Tyto podmínky a prostředí jsou popsány v literatuře (A. Barbour, J. Biol. Med. 57, str. 71 až 75, 1984). Extrakce bakteriální DNA se provádí za podmínek, které popsal

W. Simpson a kol. (Infect. Immun. 58, str. 847 až 853, 1990). Použitá technika je popsána v literatuře (J. Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. vydání. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

5

Příklad 3

Extrakce virových genomických DNA

- 10 Po kultivaci se supernatant a lýzované buňky shromáždí a celá virová suspenze se odstředí při 1000 g během 10 minut při teplotě + 4 °C k vyloučení buněčných úlomků. Pak se virové částice podrobí ultraodstředění při 400 000 g po dobu jedné hodiny při teplotě + 4 °C. Sraženina se vyjme do minimálního množství pufru (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Tato koncentrovaná virová suspenze se zpracuje proteinázou K (100 µg/ml konečný) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) (0,5% konečný) během dvou hodin při teplotě 37 °C. Virová DNA se pak extrahuje směsí fenol/chloroform a pak se vysráží se dvěma objemy absolutního ethanolu. Nechá se stát přes noc při teplotě -20 °C, DNA se odstředí při 10000 g během 15 minut při teplotě + 4 °C. Sraženina DNA se suší a vyjme se do minimálního množství sterilní ultračisté vody. Štěpí se s restrikčními
- 15 enzymy.

20

Příklad 4

Izolování genomických virových RNA

25

Virová RNA se čistí způsoby dobře známými pro pracovníky v oboru. Genomické virové RNA se pak izolují za použití extrakční techniky „thiokyanát guanidinu/fenol–chloroform“, kterou popsal P. Chomczynski a N. Sacchi (Anal.Biochem. 162, str. 156 až 159, 1987).

30

Příklad 5

Technika molekulární biologie

- 35 Všechny konstrukce plazmidů se uskutečnily standardní technikou molekulární biologie kterou popsal J. Sambrook a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, nakladatel Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989). Všechny restrikční fragmenty pro tento vynález byly izolovány pomocí kitu „GeneClean“ (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

40

Příklad 6

Technika RT-PCR

- 45 Specifické oligonukleotidy (nesoucí na koncích 5' restrikční místa k usnadnění vnějšího klonování amplifikovaných fragmentů) se syntetizují tak, že pokrývají úplně kódované oblasti genů před amplifikací (viz specifické příklady). Polymerázová řetězová reakce (PCR) spážená s reverzní transkripcí (RT) se uskutečňuje standardními technikami (J.Sambrook a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, nakladatel Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989). Každá reakce RT-PCR se provede dvojicí specifických zesilovačů a při použití
- 50 matrice RNA genomického virového extraktu. Amplifikované komplementární DNA se vyjmou do isoamylové směsi fenol/chloroform/alkohol (25:24:1) před štěpením restrikčními enzymy.

Příklad 7

Plazmid pVR1012

- 5 Plazmid pVR1012 (obr. 1) se získá podle Vical Inc. San Diego, CA, USA. Konstrukci popsal J. Hartikka a kol. (Human Gene Therapy, 7, str. 1205 až 1217, 1996).

Příklad 8

10

Konstrukce plazmidu pAB042 (gen EHV-1gB)

- Reakce PCR se provádí s genomickou DNA koňského oparového viru typu 1 (EHV-1) (kmen Kentucky D) (P. Guo a kol., J. Virol 64, str. 2399 až 2406, 1990) a s následujícími oligonukleotidy:

15

AB013 (32 mer) (SEQ ID č.1)

5'AAAACTGCAGCCGTCATGTCCTCTGGTTGCCG 3'

20

AB014 (39 mer) (SEQ ID č.2)

5'ATAAGAAGCGGCCGCTAAACATGTTTAAACCATTTTTTC 3'

25

k izolaci genu kódujícího glykoprotein gB (EHV-1 gB) ve formě fragmentu PstI-NotI. Po vyčištění se produkt PCR 2981 pb štěpí v přítomnosti PstI a NotI k izolování fragmentu PstI-NotI 2959 pb. Tento fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předem štěpeného v přítomnosti PstI a NotI, k získání plazmidu pAB042 (7841 pb) (obr. 2).

30

Příklad 9

Konstrukce plazmidu pAB031 (gen EHV-4gB)

- 35 Reakce PCR se provádí s genomickou DNA koňského oparového viru typu 4 (EHV-4) (kmen 1942) (M. Riggio a kol., J. Virol. 63, str. 1123 až 1133, 1989) a s následujícími oligonukleotidy:

AB071 (38 mer) (SEQ ID č.3)

40

5'AAAACTGCAGACATGTCCACTTGTTGCCGTGCTATTTG 3'

AB074 (36 mer) (SEQ ID č.4)

5'CTAGTCTAGATTAAACCATTTTTTCGCTTTCCATGG 3'

45

k amplifikaci fragmentu 2949 pb obsahujícího gen kódující glykoprotein gB EHV-4 ve formě fragmentu PstI-XbaI. Po vyčištění se produkt PCR štěpí v přítomnosti PstI a XbaI k získání fragmentu PstI-XbaI 2931 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného s PstI a XbaI k získání plazmidu pAB031 (7806 pb) (obr. č.3).

50

Příklad 10

Konstrukce plazmidu pAB013 (gen EHV-1 gD)

- 5 Reakce PCR se provádí s genomickou DNA koňského oparového viru typu 1 (EHV-1) (kmen Kentucky D) (J.C. Audonnet a kol., J. Gen. Virol. 71 str. 2969 až 2978, 1990) a s následujícími oligonukleotidy:

AB030 (32 mer) (SEQ ID č.5)

10

5'AAAACTGCAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATG 3'

AB031 (37 mer) (SEQ ID č.6)

15

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGGGTATATTTAACATCC 3'

k izolování genu kódujícího glykoprotein gD (EHV-1 gD) ve formě fragmentu PstI-BamHI. Po vyčištění se produkt PCR 1228 pb štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k izolování fragmentu PstI-BamHI 1211 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného

20

PstI a BamHI k získání plazmidu pAB013 (6070 pb) (obr. č. 4).

Příklad 11

- 25 Konstrukce plazmidu pAB032 (gen EHV-4 gD)

Reakce PCR se provádí s genomickou DNA koňského oparového viru typu 4 (EHV-4) (A. Cullinane a kol., J. Gen. Virol. 74, str. 1959 až 1964, 1993) a s následujícími oligonukleotidy:

30

AB075 (33 mer) (SEQ ID č.7)

5'AAAACTGCAGATATGTCTACCTTCAAGCCTATG 3'

AB076 (33 mer) (SEQ ID č.8)

35

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGAGTATATTTGAC 3'

k izolování genu kódujícího glykoprotein gD EHV-4 (EHV-4gD) ve formě fragmentu PstI-BamHI. Po vyčištění se produkt PCR 1230 pb štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k izolování fragmentu PstI-BamHI 1212 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti PstI a BamHI k získání plazmidu pAB032 (6071 pb) (obr. č.5).

40

Příklad 12

45

Konstrukce plazmidu pAB043 (chřipkový koňský gen HA kmen Praha)

Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou DNA koňského viru chřipky (Equine influenza Virus nebo EIV) (kmen H7N7 Praha) (J. McCauley číslo dostupnosti sekvence v genové bance = X62552), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

50

AB015 (36 mer) (SEQ ID č.9)

55

5'ACGCGTCGACATGAACACTCAAATTCTAATATTAGC 3'

AB016 (35 mer) (SEQ ID č.10)

5'CGCGGATCCCTTATATACAAATAGTGCCACCGCATG 3'

5

k izolování genu kódujícího glykoprotein HA koňského viru chřipky ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění se produkt RT PCR 1733 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall–BamHI 1720 pb. Fragment se liguje do vektoru PVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB043 (6588 pb) (obr. č. 6).

10

Příklad 13

Konstrukce plazmidu pAB033 (koňského chřipkový gen HA kmen Suffolk)

15

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou DNA koňského viru chřipky (EIV) (kmen Suffolk) (M. Binns číslo dostupnosti sekvence v genové bance = X68437), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

20

AB077 (33 mer) (SEQ ID č.11)

5'ACGCGTCGACGCATGAAGACAACCATTATTTTG 3'

AB078 (34 mer) (SEQ ID č.12)

25

5'CGCGGATCCTCAAATGCAAATGTTGCATCTGATG 3'

30

k izolování genu kódujícího glykoprotein HA koňského viru chřipky ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění se produkt RT PCR 1729 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall–BamHI 1717 pb. Fragment se liguje do vektoru PVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB033 (6584 pb) (obr. č.7).

Příklad 14

35

Konstrukce plazmidu pAB099 (koňského chřipkový gen HA kmen Fontainebleau)

40

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA koňského viru chřipky (EIV) (kmen Fontainebleau), připraveného podle příkladu 4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB186 (32 mer) (SEQ ID č.13)

5'TTTGCGGCCGCATGAAGACAACCATTATTTTG 3'

45

AB187 (35 mer) (SEQ ID č.14)

5'TTTGCGGCCGCTTACTCAAATGCAAATGTTGCATC 3'

50

k izolování genu kódujícího glykoprotein HA viru koňské chřipky (kmen Fontainebleau) (obr. č. 8 a SEQ ID č. 15) ve formě fragmentu NotI–NotI. Po vyčištění se produkt RT PCR 1724 pb štěpí v přítomnosti NotI k izolování fragmentu NotI–NotI 1710 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti NotI k získání plazmidu PAB099 (6625 pb), který obsahuje gen HA (chřipkový koňský kmen Fontainebleau) v dobré orientaci vůči promotoru (obr. č. 9).

55

Příklad 15

Konstrukce plazmidu pAB085 (chřipkový koňský gen NP kmen Praha)

Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou DNA viru koňské chřipky (EIV) (kmen H7N7 Praha) (O. Gorman a kol., J. Virol. 65. str. 3704 až 3714, 1991), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB156 (32 mer) (SEQ ID č.16)

5'CCGGTCGACATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG 3'

AB159 (34 mer) (SEQ ID č.17)

5'CGCGGATCCTTAATTGTCAAACCTCTTCTGCATTG 3'

k izolování genu kódujícího glykoprotein NP viru koňské chřipky ve formě fragmentu Sall-BamHI. Po vyčištění se produkt RT PCR 1515 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall-BamHI 1503 pb. Fragment se liguje do vektoru PVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného Sall a BamHI k získání plazmidu pAB085 (6371 pb) (obr. č.10).

Příklad 16

Konstrukce plazmidu pAB084 (chřipkový koňský gen NP kmen Jillin)

Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou DNA viru koňské chřipky (EIV) (kmen H3N8 Jillin) (O. Gorman a kol., J. Virol. 65. str. 3704 až 3714, 1991), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB156 (32 mer) (SEQ ID č.16)

5'CCGGTCGACATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG 3'

AB157 (34 mer) (SEQ ID č.18)

5'CGCGGATCCTTAATTGTCATATTCCTCTGCATTG 3'

k izolování genu kódujícího glykoprotein NP viru koňské chřipky ve formě fragmentu Sall-BamHI. Po vyčištění se produkt RT PCR 1515 pb štěpí je pomocí Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall-BamHI 1503 pb. Fragment se liguje do vektoru PVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB084 (6371 pb) (obr. č.11).

Příklad 17

Konstrukce plazmidu pAB070 (podjednotkový gen C tetanového toxinu)

Reakce PCR se provádí s genomickou DNA Clostridium tetani (kmen CN3911) (J. Fairweather a kol., J. Bact. 165, str. 21 až 27, 1986), připravenou způsobem popsaným v příkladu č. 2 a s následujícími oligonukleotidy:

AB128 (34 mer) (SEQ ID č.19)

5'AAACTGCAGATGAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG 3'

5 AB129 (30 mer) (SEQ ID č.20)

5'TTTGGATCCTTAATCATTGTCCATCCTTC 3'

10 k izolování sekvence kódující podjednotku C toxinu *Clostridium tetani* ve formě fragmentu PstI–BamHI. Po vyčištění se produkt PCR 1377 pb štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k izolování fragmentu PstI–BamHI 1361 pb. Fragment se liguje do vektoru PVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti PstI a BamHI k získání plazmidu pAB070 (6219 pb) (obr. č.12).

15 Příklad 18

Konstrukce plazmidu pAB017 (gen *ospA* *Borrelia burgdorferi*)

20 Reakce PCR se provádí s genomickou DNA *Borrelia burgdorferi* (kmen B31) (s. Bergstrom a kol., Mol. Microbiol 3, str. 479 až 486, 1989), připravenou způsobem popsaným v příkladu č. 2 a s následujícími oligonukleotidy:

AB038 (37 mer) (SEQ ID č.21)

25 5'ACGCGTCGACTATGAAAAATATTTATTGGGAATAGG 3'

AB039 (34 mer) (SEQ ID č.22)

5'CGCGGATCCCTTATTTTAAAGCGTTTTTAATTTC 3'

30 k izolování genu kódujícího protein membrány *OspA* ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění se produkt PCR 842 pb štěpí pomocí Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall–BamHI 829 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7) předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB017 (5698 pb) (obr. č.13).

35

Příklad 19

Konstrukce plazmidu pAB094 (gen E2 viru východní encefalitidy)

40

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru východní encefalitidy (EEV) (kmen North America 82V2137) (S. Weaver a kol., Virology 197, str. 375 až 390, 1993), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

45 AB176 (34 mer) (SEQ ID č.23)

5'AAACTGCAGATGGATTTGGACACTCATTTACCCC 3'

AB177 (44 mer) (SEQ ID č.24)

50

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCATGCCCTCGTCGGCTTAATGCAG 3'

k izolování genu kódujícího glykoprotein E2 EEV ve formě fragmentu PstI–BamHI. Po vyčištění se produkt RT–PCR 1294 pb štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k izolování fragmentu PstI–

BamHI 1278 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7), předběžně štěpeného v přítomnosti PstI a BamHI k získání plazmidu pAB094 (6136 pb) (obr. č.14).

5 Příklad 20

Konstrukce plazmidu pAB093 (gen C viru východní encefalitidy)

10 Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru východní encefalitidy (EEV) (kmen North America 82V2137) (S.Weaver a kol., Virology 197, str. 375 až 390, 1993), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB174 (33 mer) (SEQ ID č.25)

15 5'AAACTGCAGATGTTCCCATACCCTACACTTAAC 3'

AB175 (45 mer) (SEQ ID č.26)

5'TGAAGATCTTCAATAAAAAATCACCATGGCTCTGACCCCTCTGGTG 3'

20 k izolování genu kódujícího protein kapsidu C (EEV C) ve formě fragmentu PstI-BglII. Po vyčištění se produkt RT-PCR 801 pb štěpí v přítomnosti PstI a BglII k izolování fragmentu PstI-BglII 785 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7), předběžně štěpeného v přítomnosti PstI a BglII k získání plazmidu pAB093 (5650 pb) (obr. č.15).

25

Příklad 21

Konstrukce plazmidu pAB096 (gen E2 viru západní encefalitidy)

30

Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru západní encefalitidy (WEV) (kmen BSF1703) (C. Hahn a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. Sp. st. a., 85, str. 5997 až 6001, 1988), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

35

AB180 (35 mer) (SEQ ID č.27)

5'ACGCGTCGACATGAGCATTACCGATGACTTCACAC 3'

40

AB181 (44 mer) (SEQ ID č.28)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAAATCAAGCGTTGGTTGGCCGAATACAG 3'

45 k izolování genu kódujícího glykoprotein E2 WEV ve formě fragmentu Sall-BamHI. Po vyčištění se produkt RT-PCR 1304 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall-BamHI 1291 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad č. 7), předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB096 (6159 pb) (obr. č.16).

50 Příklad 22

Konstrukce plazmidu pAB095 (gen C viru západní encefalitidy)

55 Reakce RT-PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru západní encefalitidy (WEV) (kmen BSF1703) (C.Hahn a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. Sp. st. a. 85,

str. 5997 až 6001, 1988), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB178 (34 mer) (SEQ ID č.29)

5'ACGCGTCGACATGTTTCCATACCCTCAGCTGAAC 3'

AB179 (44 mer) (SEQ ID č.30)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAAATCACCACGGTTCAGAACCTTCGGGG 3'

k izolování genu kódujícího protein kapsidu C viru WEV ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění se produkt RT–PCR 809 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall–BamHI 796 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad 7), předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB095 (5664 pb) (obr. č.17).

Příklad 23

Konstrukce plazmidu pAB098 (gen E2 viru venezuelské encefalitidy)

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru venezuelské encefalitidy (VEV) (kmen P676 (typ IC)) (R. Kinney a kol., Virology 191, str. 569 až 580, 1992), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy;

AB184 (35 mer) (SEQ ID č.31)

5'ACGCGTCGACATGTCCACCGAGGAGCTGTTTAAGG 3'

AB185 (44 mer) (SEQ ID č.32)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAAATCAGGCCCGGGCAGTGCGGGCGCAG 3'

k izolování genu kódujícího glykoproteinprotein E2 viru VEV ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění se produkt RT–PCR 1304 pb štěpí v přítomnosti Sall a BamHI k izolování fragmentu Sall–BamHI 1291 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad č. 7), předběžně štěpeného v přítomnosti Sall a BamHI k získání plazmidu pAB098 (6159 pb) (obr. č.18).

Příklad 24

Konstrukce plazmidu pAB097 (gen C viru venezuelské encefalitidy)

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru venezuelské encefalitidy (VEV) (kmen P676 (typ IC)) (R. Kinney a kol., Virology 191, str. 569 až 580, 1992), připraveného způsobem popsaným v příkladu č. 4 a s následujícími oligonukleotidy;

AB182 (30 mer) (SEQ ID č.33)

5'AAACTGCAGATGTTCCCGTTCCAGCCAATG 3'

AB183 (45 mer) (SEQ ID č.34)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAAATCACCATTGCTCGCAGTTCTCCGGAG 3'

k izolování genu kódujícího protein kapsidu C viru VEV ve formě fragmentu PstI–BamHI. Po vyčištění se produkt RT–PCR 856 pb štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k izolování fragmentu PstI–BamHI 839 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad č. 7), předběžně štěpeného PstI a BamHI k získání plazmidu pAB097 (5698 pb) (obr. č.19).

Příklad 25

Konstrukce plazmidu pAB041 (gen G viru vztekliny)

Reakce RT–PCR se provádí způsobem popsaným v příkladu 6 s genomickou RNA viru vztekliny (kmen ERA) (A. Anilionis a kol., Nature 294, str. 275 až 278, 1981), připraveného způsobem popsaným v příkladu č.4 a s následujícími oligonukleotidy:

AB011 (33 mer) (SEQ ID č.35)

5'AAAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID č.36)

5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'

k zesílení fragmentu 1589 pb obsahujícího gen kódující protein G viru vztekliny. Po vyčištění se produkt RT–PCR štěpí v přítomnosti PstI a BamHI k získání fragmentu PstI–BamHI 1578 pb. Fragment se liguje do vektoru pVR1012 (příklad č. 7), předběžně štěpeného v přítomnosti PstI a BamHI k získání plazmidu pAB041 (6437 pb) (obr. č. 20).

Příklad 26

Příprava a čištění plazmidů

K přípravě plazmidu, určených k vakcinaci zvířat, je možno použít veškeré techniky dovolující získat suspenzi vyčištěných plazmidů převážně ve formě superzavinuté. Tyto techniky jsou pracovníkům v oboru dobře známy. Citovat lze zejména techniku alkalické lyse následované dvakrát po sobě následujícím ultraodstředěním pod gradientem chloridu cesného v přítomnosti bromidu ethidium, jak je popsal J. Sambrook a kol. (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989). Lze se též orientovat na patentové spisy PCT WO 95/21250 a PCT WO 96/02658, které popisují způsoby průmyslové výroby plazmidů použitelných k vakcinaci. Pro účel výroby vakcín (viz příklad 17), jsou vyčištěné plazmidy resuspendovány způsobem k získání vysoce koncentrovaných roztoků (více než 2 mg/ml) vhodných ke skladování. K tomu jsou plazmidy resuspendovány buď v ultra-čisté vodě, nebo v pufru TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

Příklad 27

Výroba asociovaných vakcín

Různé plazmidy, potřebné k výrobě asociované vakcíny, se smísí z jejich koncentrovaných roztoků (příklad 16). Smísení se provede tak, aby konečná koncentrace každého plazmidu odpovídala účinné dávce každého plazmidu. Použitelnými roztoky k nastavení konečné koncentrace vakcíny mohou být buď 0,9% roztok chloridu sodného, nebo pufr PBS. K výrobě vakcín přicházejí v úvahu také zvláštní formulace, jako jsou liposomy a kationtové lipidy.

Příklad 28

Vakcinace koní

Koně se vakcinují dávkami 100, 250 nebo 500 µg na plazmid.

Injektovat se dá intramuskulárně injekční stříkačkou do krčních svalů. V tomto případě jsou vakcinační dávky podávány ve množství 2 ml. Injektovat lze také intradermicky za použití tryskového kapalinového injekčního přístroje (bez injekční jehly) dodávajícího 0,2 ml v 5 místech (0,04 ml na jedno místo) (například přístrojem „PIGJET“). V tomto případě jsou dávky vakcíny podávány v objemech 0,2 nebo 0,4 ml, což odpovídá jednomu nebo dvěma podáním. Pokud se provádějí dvě po sobě následující podání pomocí přístroje PIGJET, provádějí se posunutým způsobem tak, že dvě zóny injekece jsou od sebe vzdáleny přibližně 1 až 2 cm.

Průmyslová využitelnost

Složení vakcíny pro ošetřování koní napadených různým virovým onemocněním a k prevenci takových onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Imunogenní kompozice pro vyvolání u savce čeledi koňovitých imunologické odezvy proti viru rinopneumonitidy savců čeledi koňovitých (EHV), **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje alespoň jeden plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nebo molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci nebo sekvence kódující EHV gB, gD nebo gB a gD, a farmaceuticky přijatelný nosič.

2. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nebo molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci nebo sekvence kódující EHV gB a gD.

3. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje první plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující EHV gB, a druhý plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce hostitele čeledi koňovitých molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující EHV gD.

4. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-1.

5. Imunogenní kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-1.

6. Imunogenní kompozice podle nároku 3, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-1.

7. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-4.

8. Imunogenní kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-4.

9. Imunogenní kompozice podle nároku 3, **v y z n a ě n á t í m**, že EHV je EHV-4.

10. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že molekula nebo molekuly nukleové kyseliny obsahují sekvenci pocházející z EHV-1 a sekvenci pocházející z EHV-4.

5 11. Imunogenní kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že molekula nebo molekuly nukleové kyseliny obsahují sekvenci pocházející z EHV-1 a sekvenci pocházející z EHV-4.

12. Imunogenní kompozice podle nároku 3, **v y z n a ě n á t í m**, že molekula nebo molekuly nukleové kyseliny obsahují sekvenci pocházející z EHV-1 a sekvenci pocházející z EHV-4.

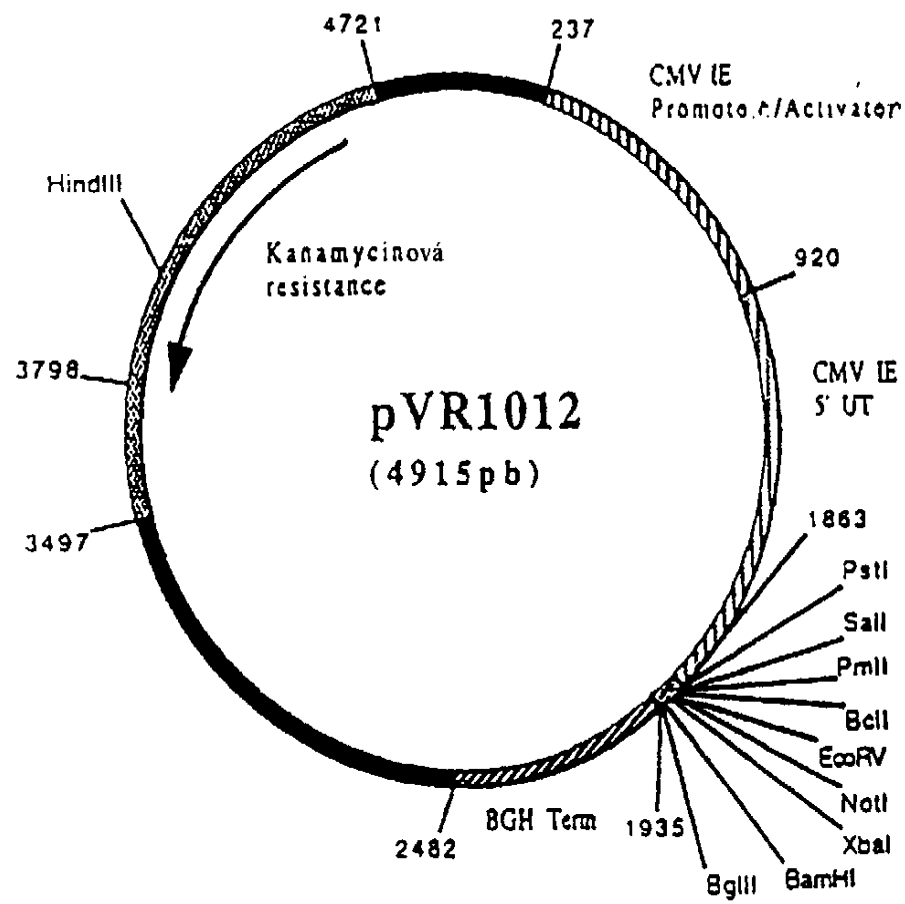
10 13. Použití kompozice podle některého z nároků 1 až 12 pro výrobu léčiva pro vyvolání imunologické odezvy u savce čeledi koňovitých a určeného pro podání následující po podání savci čeledi koňovitých vakcíny zvolené ze souboru zahrnujícího celou živou vakcínu, inaktivovanou celou vakcínu, podjednotkovou vakcínu a rekombinantní vakcínu.

15 14. Použití kompozice podle některého z nároků 1 až 12 pro výrobu léčiva pro vyvolání imunologické odezvy u savce čeledi koňovitých.

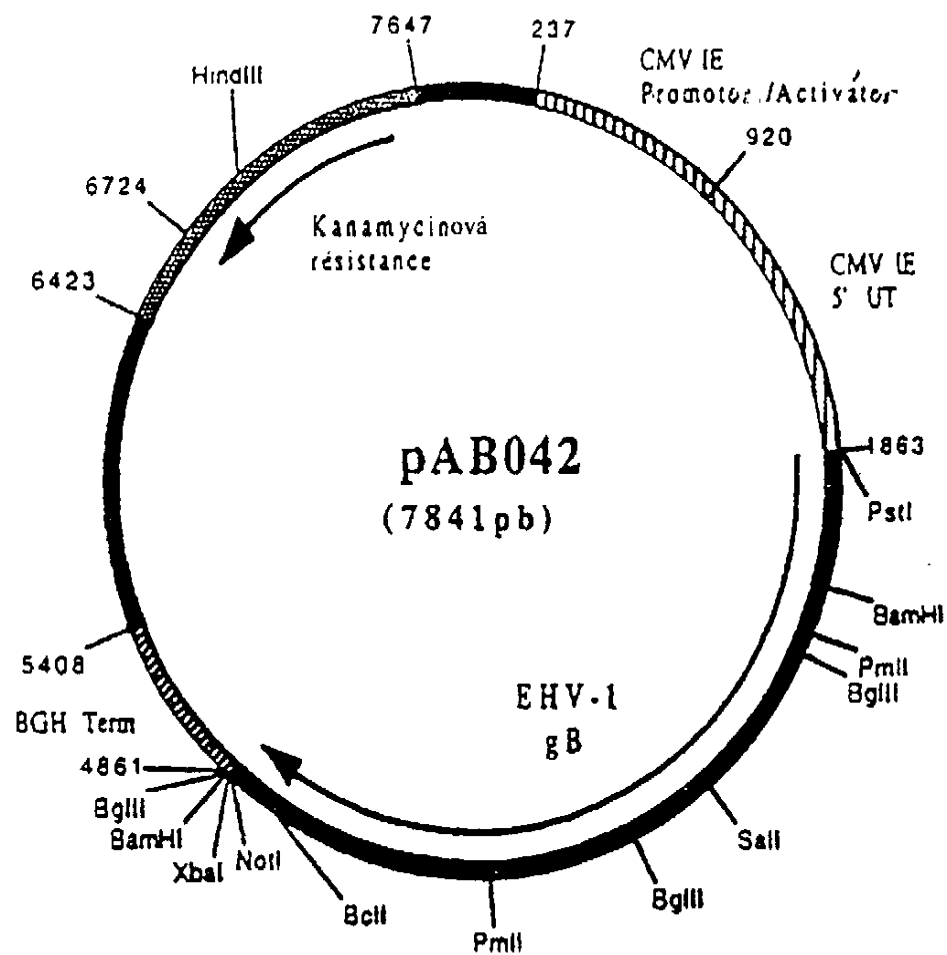
20 15. Souprava, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje (i) imunogenní kompozici podle některého z nároků 1 až 12 a (ii) koňskou vakcínu zvolenou ze souboru zahrnujícího celou živou vakcínu, inaktivovanou celou vakcínu, podjednotkovou vakcínu a rekombinantní vakcínu.

25

21 výkresů

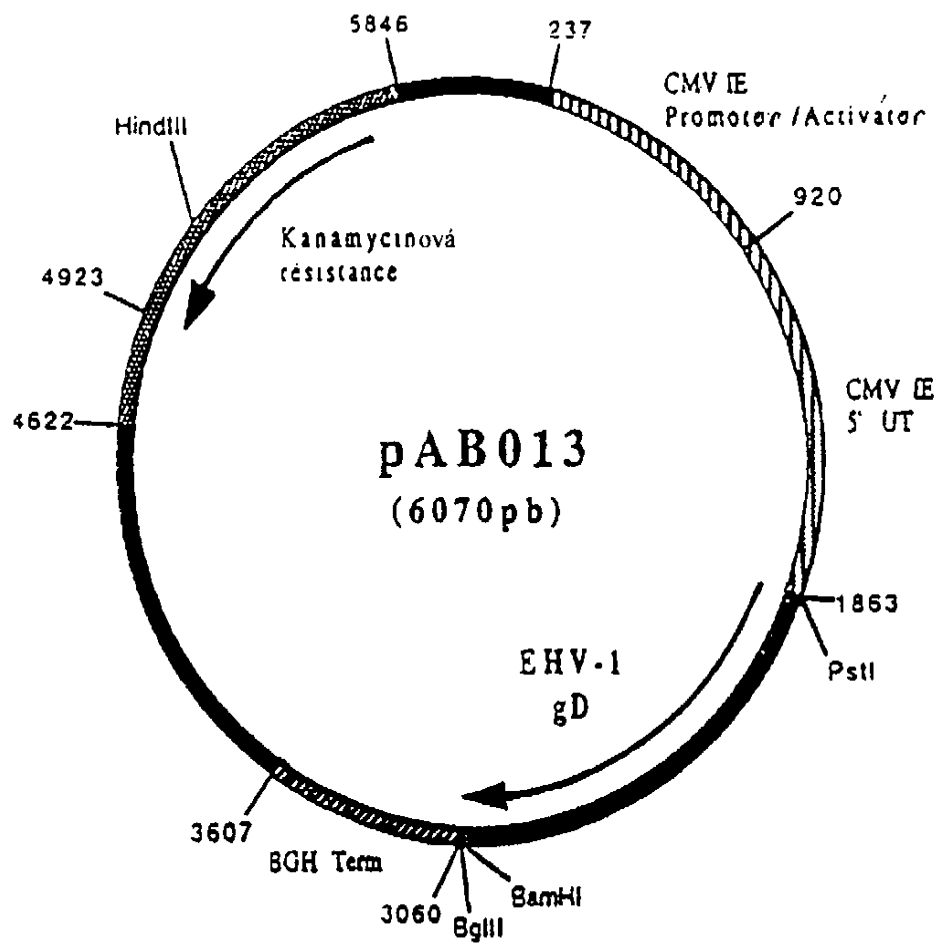


Obr. 1

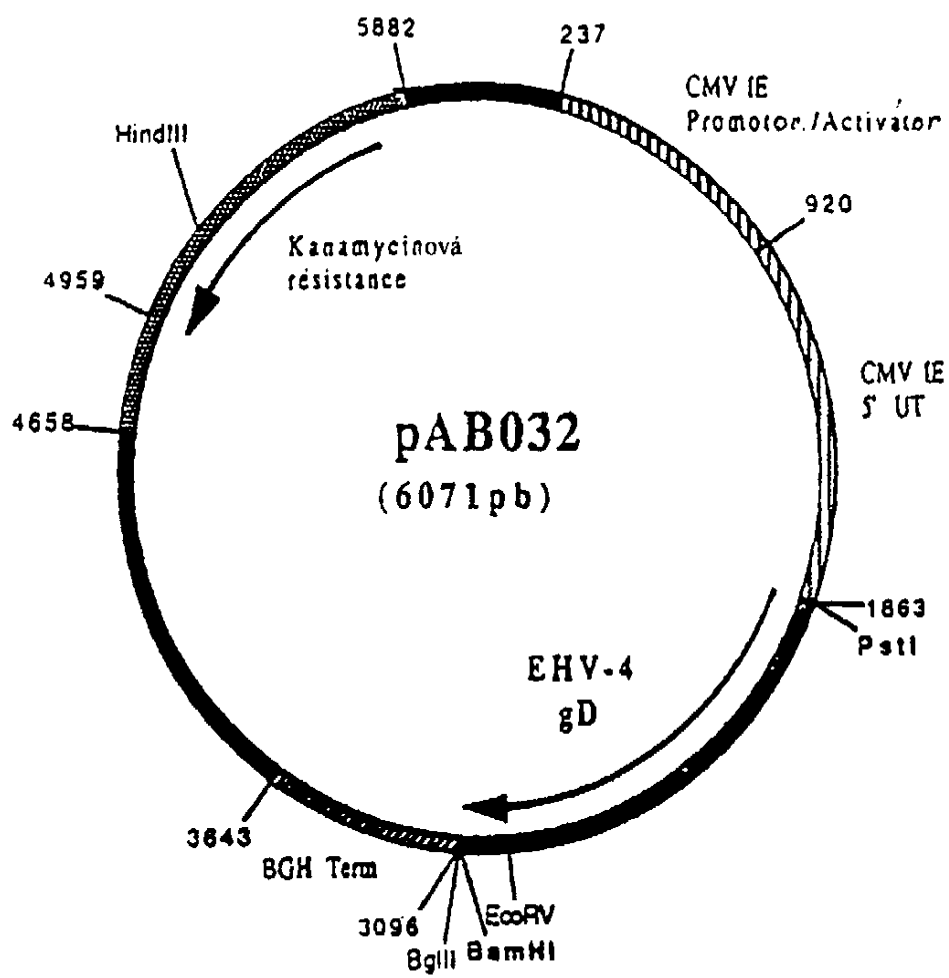


Obr. 2

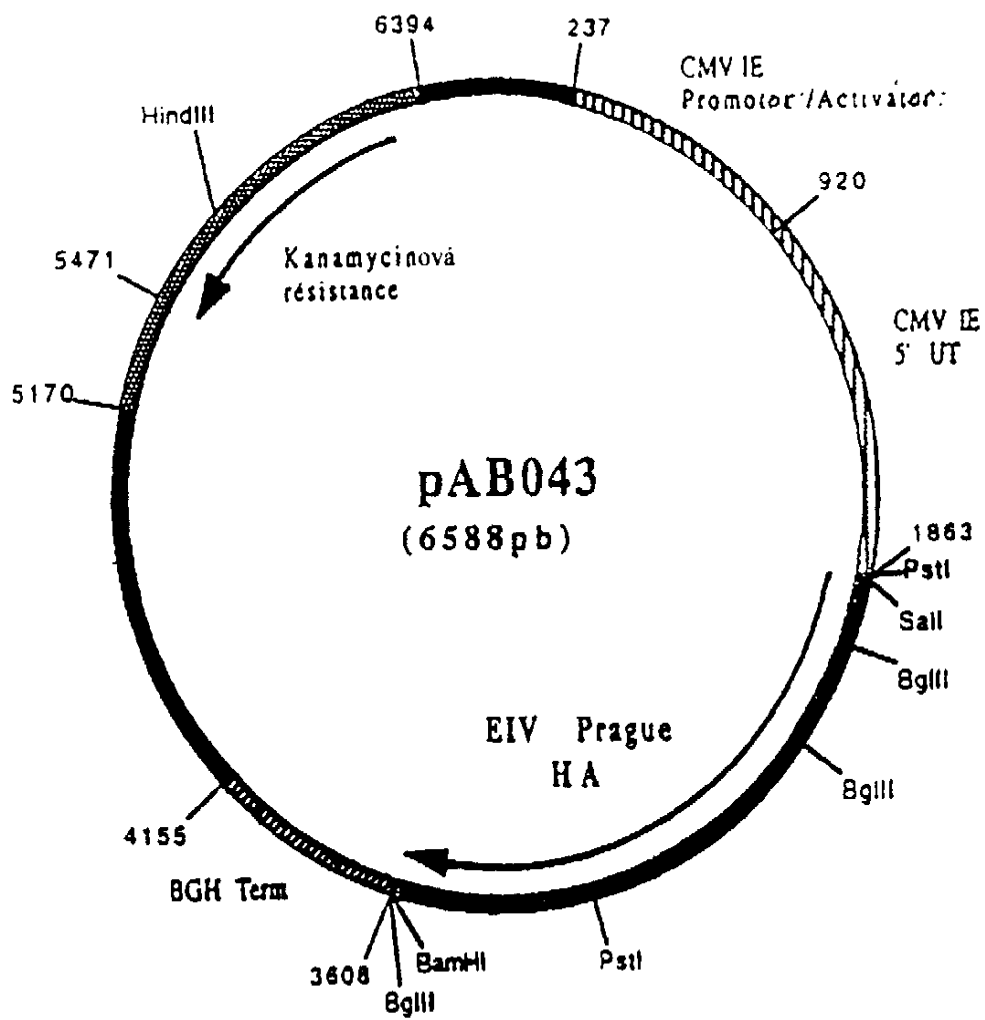
- 19 -



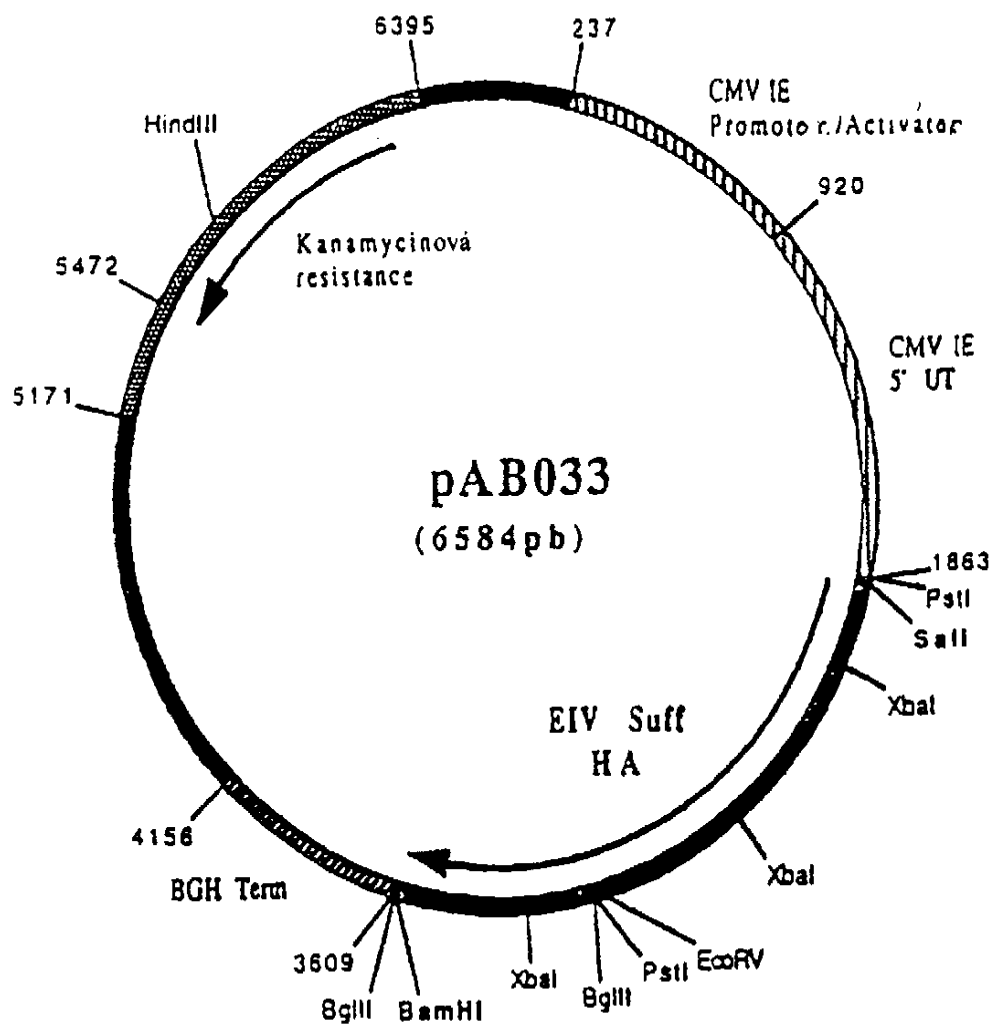
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

1 ATGAAGACAACCATTATTTTGGATACTACTGACCCATTGGGTCTACAGTCAAAACCCAACCAG
 1 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser
 54 GGCAACAACACAGCCACACTATGTCTGGGACACCATGCAGTAGCAAATGGAACATTGGTAAA
 22 Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Tyr
 127 ACAATAACTGACGACCAAATTGAGGTGACAAATGCTACTGAATTAGTTTCAGAGCACTTCAAT/
 43 Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Thr Ser Ile
 190 GGGAAATATGCAACAACCCATATAGGGTTCTAGATGGAAGAAACTGCACATTAATAGATGCA/
 64 Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala
 253 ATGCTAGGAGATCCCCACTGTGATGTTTTTTCAGTATGAGAATTGGGACCTCTTCATAGAAAAGA
 85 Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg
 316 AGCAGCGCTTTTCAGCAATTGCTACCCATATGACATCCCTGACTATGCATCGCTCCGGTCTATT
 106 Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile
 379 GTGGCATCTTCAGGAACATTAGAATTCACAGCAGAGGGATTACATGGACAGGTGTCACTCAA
 127 Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln
 442 AACGGAAGAAGTGGCGCCTGCAGAAGGGGATCAGCCGATAGTTTCTTTAGCCGACTGAATTGG
 148 Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Arg Arg Gly Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp
 505 CTAACAGAATCTGGAAATCTTACCCACATTGAATGTAACAATGCCTAACAATAACAATTTTC
 169 Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asn Asn Phe
 568 GATAAACTATACATCTGGGGGATCCATCACCCGAGCACAAACAATGAGCAGACAAAATTGTAT
 190 Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Asn Asn Glu Gln Thr Lys Leu Tyr
 631 GTCCAAGAATTAGGGCGAGTAACAGTCTCAACAAAAAGAAGTCAACAAACAATAATCCCCAAC
 211 Val Gln Glu Leu Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn
 694 ATCGGATCTAGACCGGGGTCAGGGGTCAATCAGGCAGGATAAGCATATATTGGACCATTGTG
 232 Ile Gly Ser Arg Pro Gly Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
 757 AAACCTGGAGATATCCTAATGATAAACAGTAATGGCAACTTAGTTGCACCGCGGGGATATTTTC
 253 Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe
 820 AAAATGCGAACAGGAAAAAGCTCTATAATGAGATCAGATGCACCCATAGACACTTGTGTGTCC
 274 Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Thr Cys Val Ser
 883 GAGTGTATTACACCAAATGGAAGCATCCCCAACGACAAACCATTTCAAAATGTGAACAAAGTT
 295 Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val
 946 ACATATGGAAAATGCCCAAGTATATCAAGCAGAATACTTTGAAGCTGGCCACTGGGATGAGG
 316 Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 1009 AATGTACCAGAAAAGCAAATCAGAGGAATCTTTGGAGCAATAGCGGGATTTCATAGAAAATGCC
 337 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly
 1072 TGGGAGGGAATGGTTTCATGGGTGGTATGGATTCCGATATCAGAATTCCGGAAGGAACAGGACAA
 358 Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
 1135 GCTGCAGATCTAAAGAGCACTCAAGCAGCCATCGACCAGATCAATGGAAAATTGAACAGAGTG
 379 Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val

Obr. 8

1198 ATTGAGAGGACCAATGAGAAATTCCATCAAATAGAGAAGGAATTCTCAGAAGTAGAAGGGA(
 400▶ IleGluArgThrAsnGluLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerGluValGluGlyA:

1261 ATCCAGGACTTGGAGAAGTATGTAGAAGACACCAAAATAGACCTATGGTCCTACAATGCAG(
 421▶ IleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAlaG:

1324 TTA CTGGTGGCTCTAGAAAATCAACATACGATTGACTTAACAGATGCAGAGATGAATAAAT(
 442▶ LeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspAlaGluMetAsnLysLe

1387 TTCGAGAAGACTAGGCGCCAGTTAAGAGAAAACGCGGAAGACATGGGGGGTGGATGTTTCAA
 463▶ PheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyGlyGlyCysPheLy

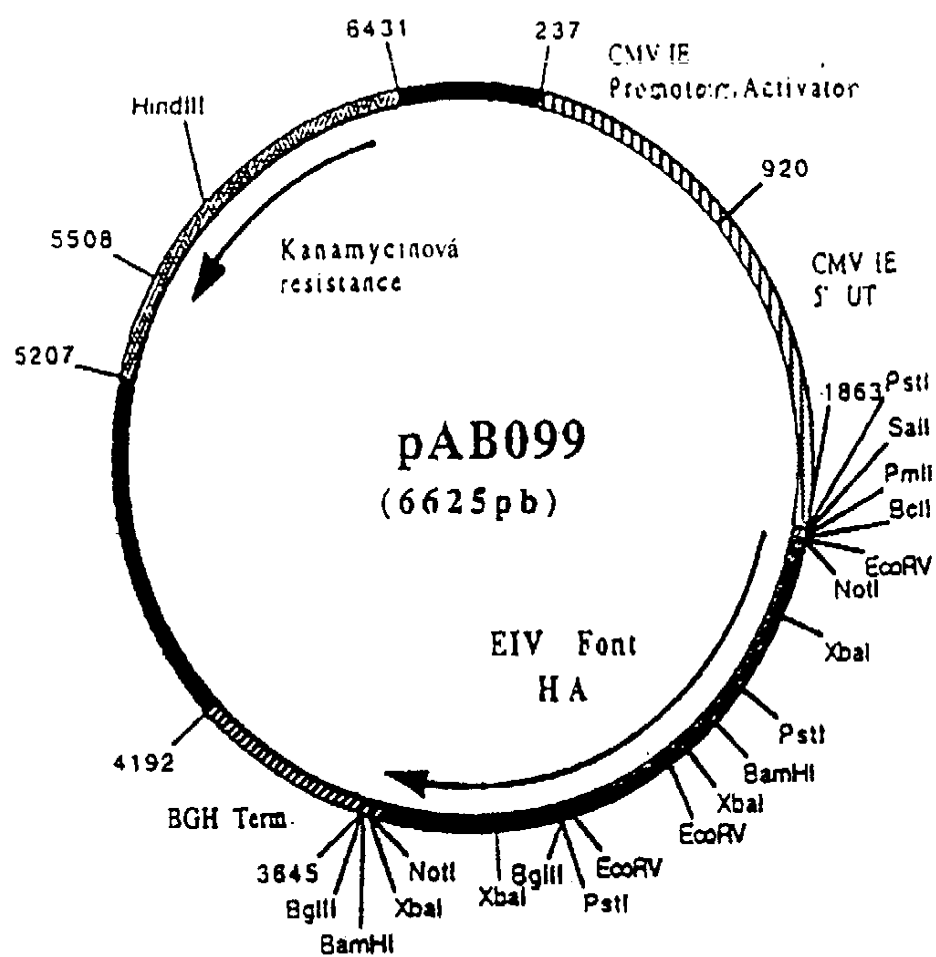
1450 ATTTATCACAAATGTGATAATGCATGCATTGGATCAATAAGAAATGGGACATATGACCATT(
 484▶ IleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGlySerIleArgAsnGlyThrTyrAspHisTy

1513 ATATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGATTTCAAATTAAGGTGTTGAGTTGAAATCAGG
 505▶ IleTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSerGl

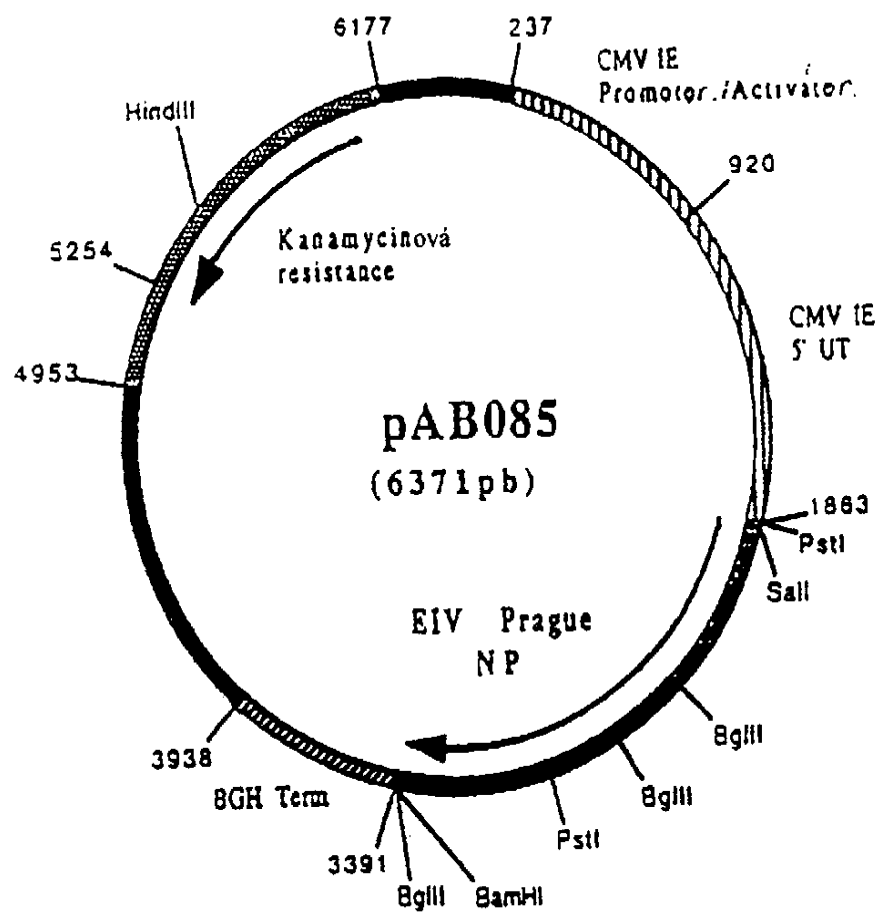
1576 TACAAAGATTGGATACTGTGGATTTTCATTGCCATATCATGCTTCTTAATTTGCGTTGTTCT
 526▶ TyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerPheAlaIleSerCysPheLeuIleCysValValLe

1639 TTGGGTTTCATTATGTGGGCTTGCCAAAAGGCAACATCAGATGCAACATTTGCATTTGA
 547▶ LeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

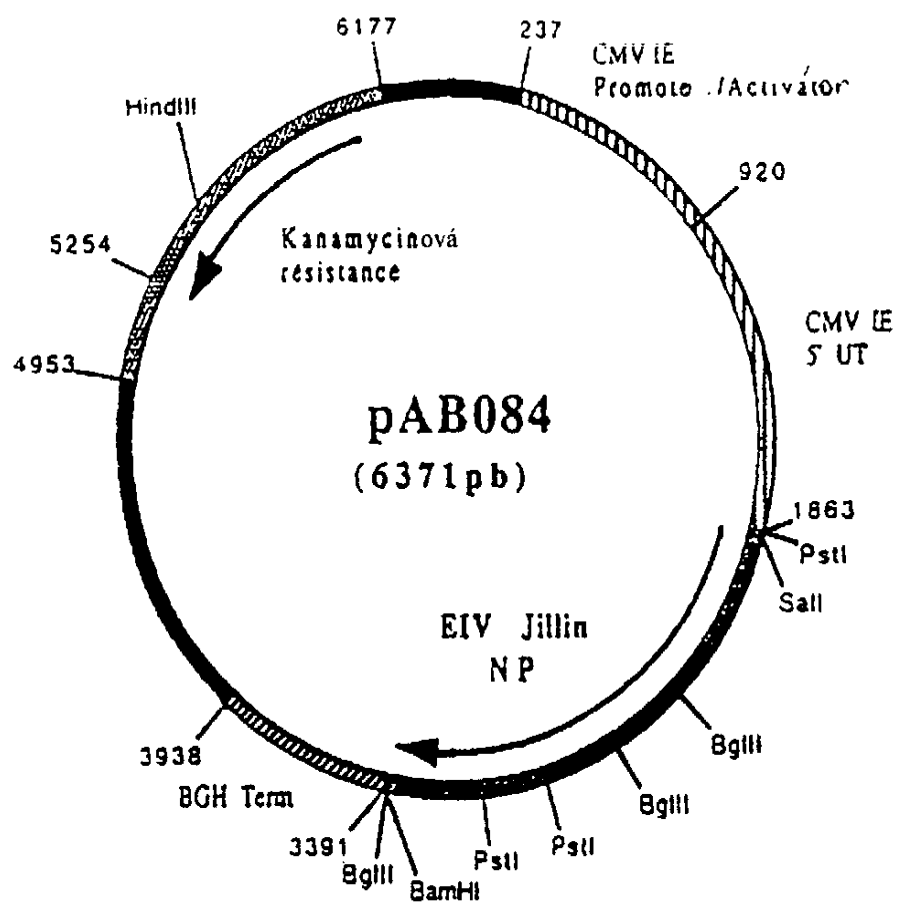
Obr. 8 (pokračování)



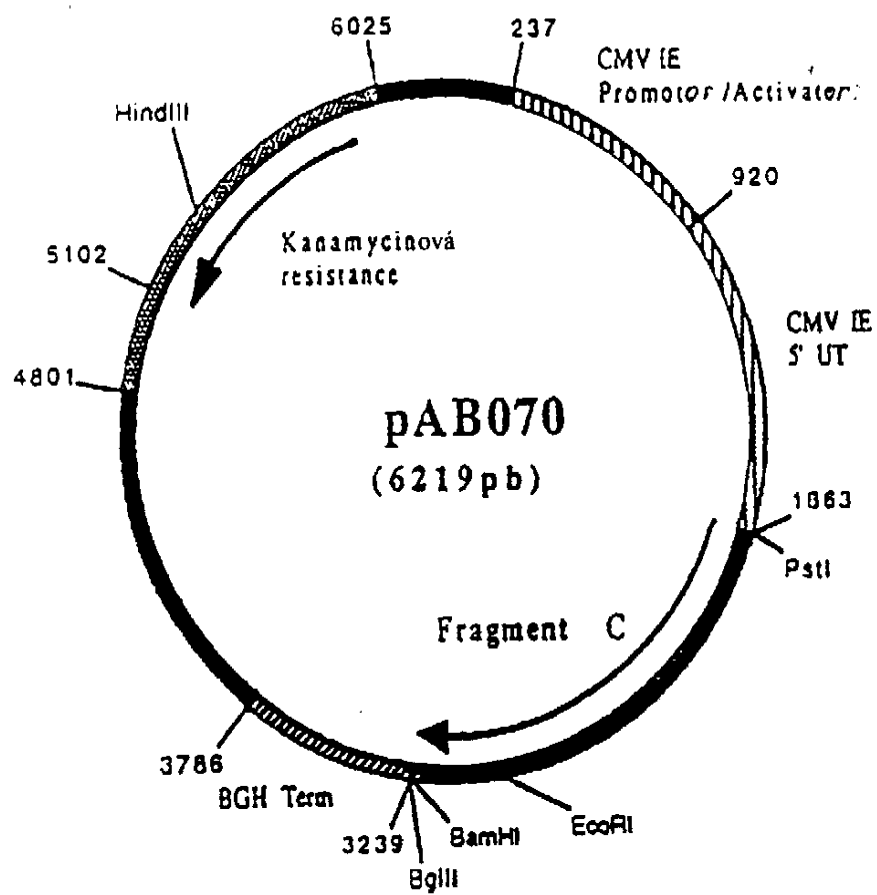
Obr. 9



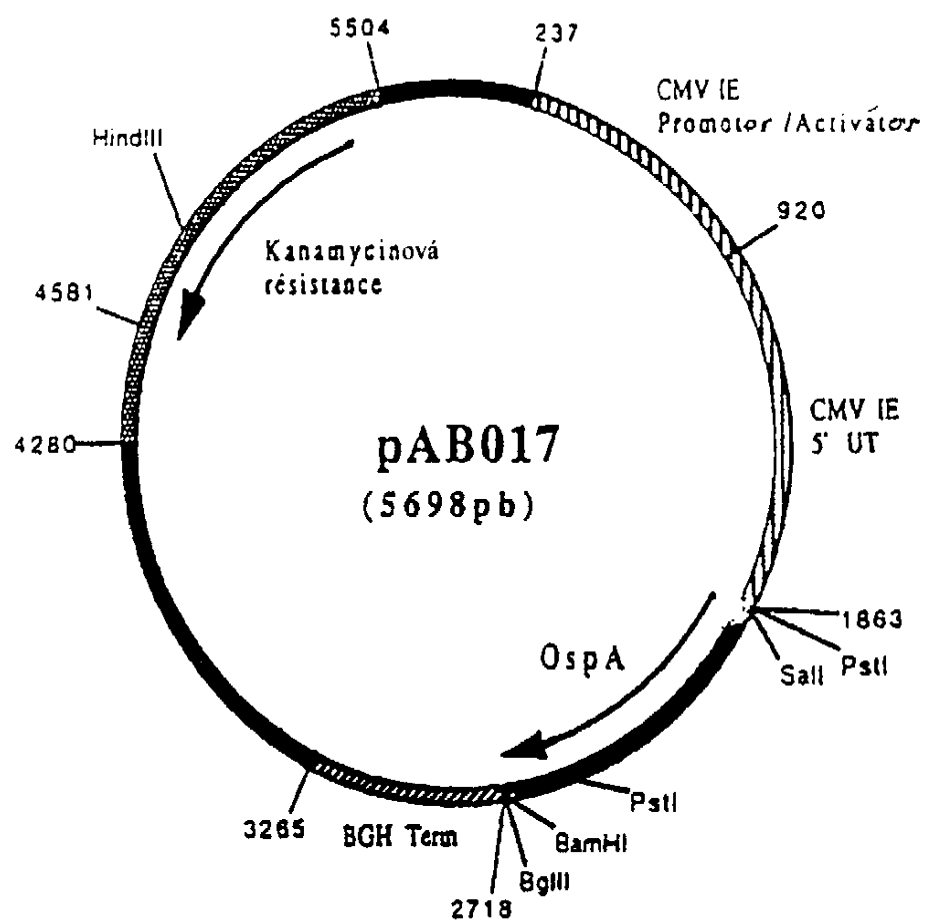
Obr. 10



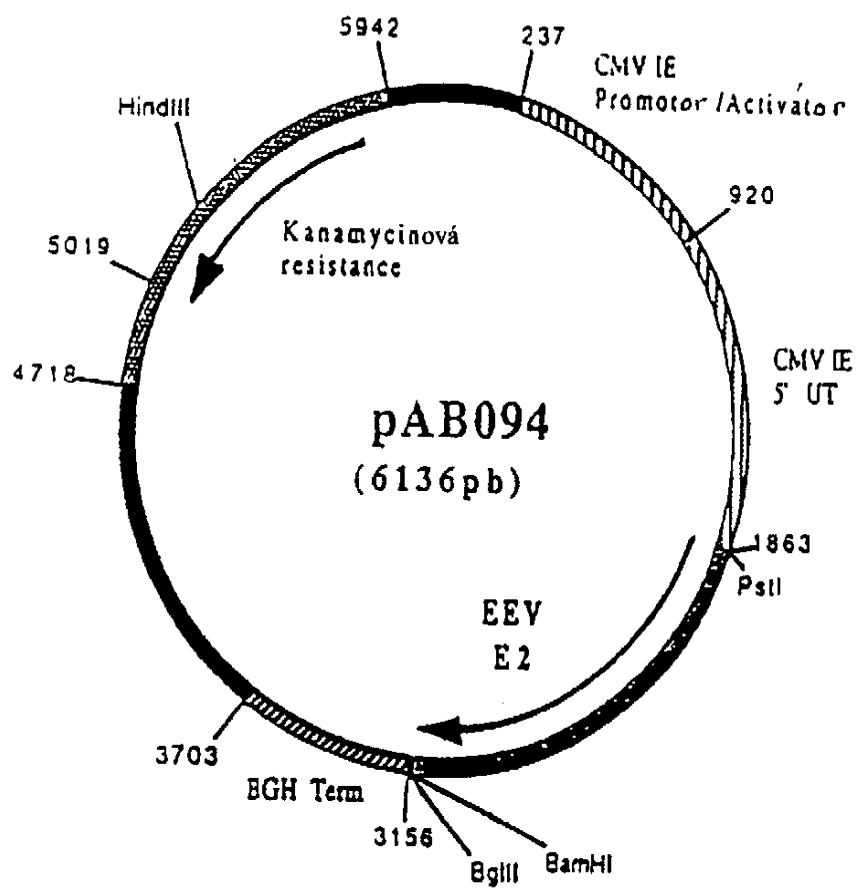
Obr. 11



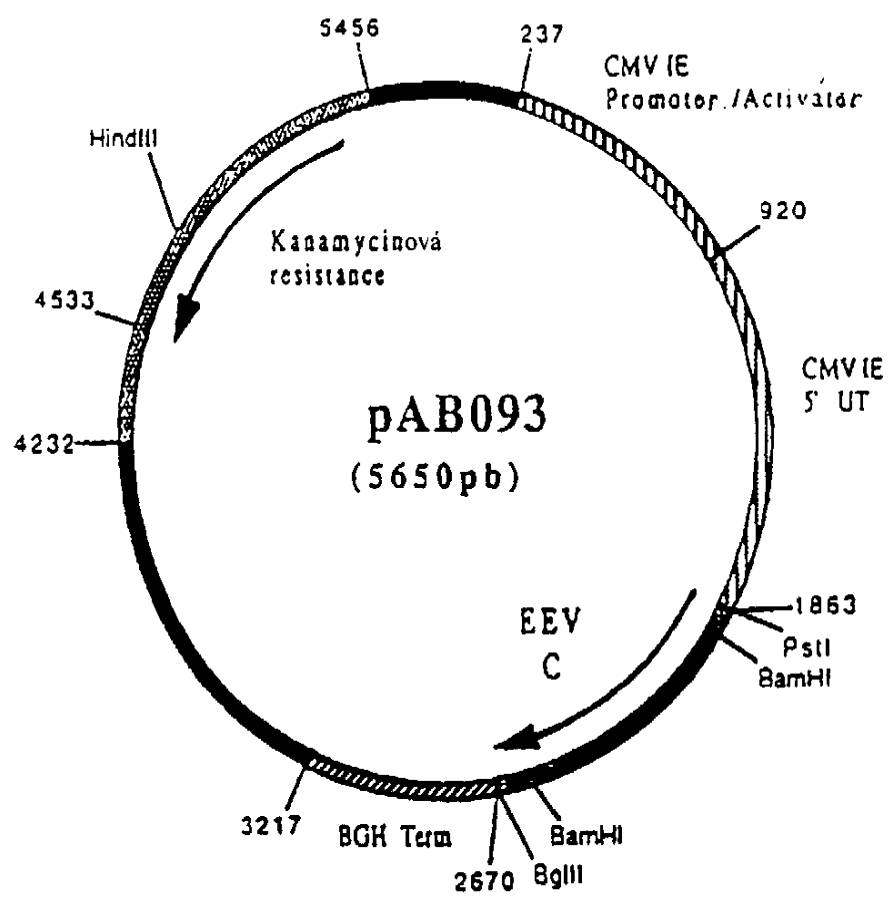
Obr. 12



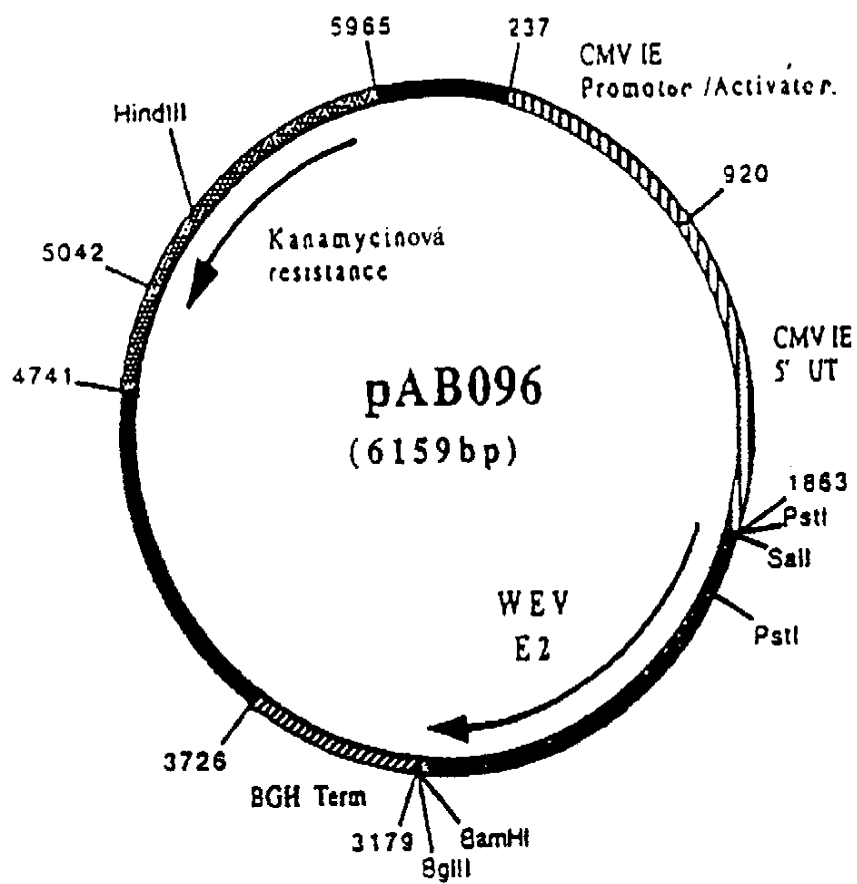
Obr. 13



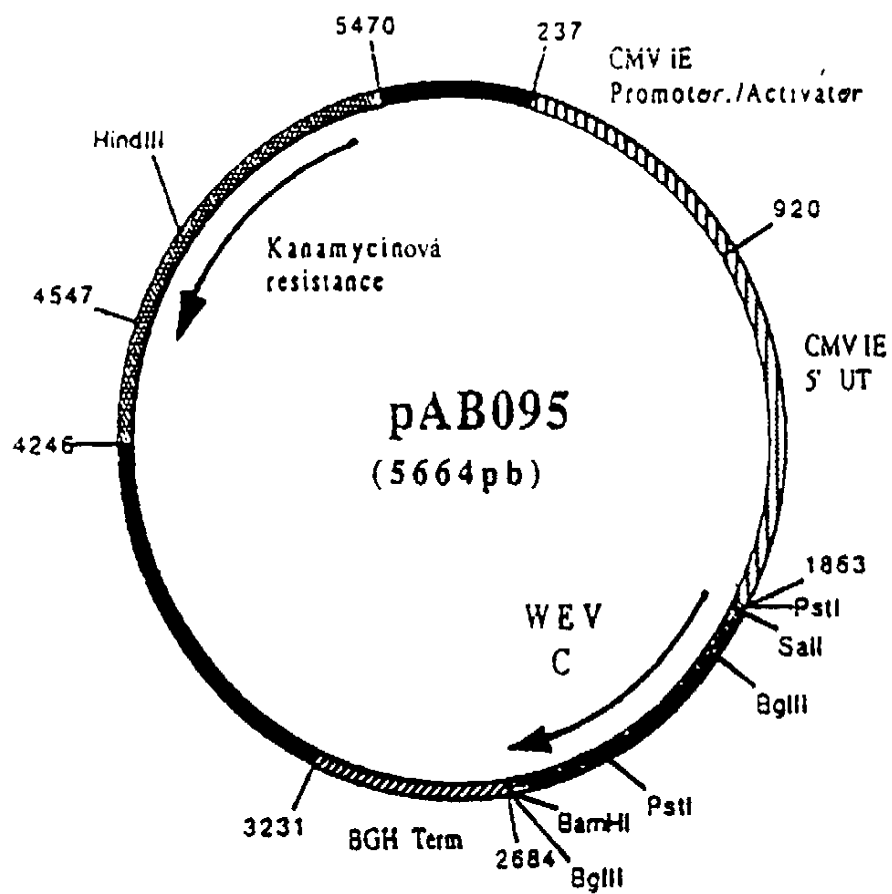
Obr. 14



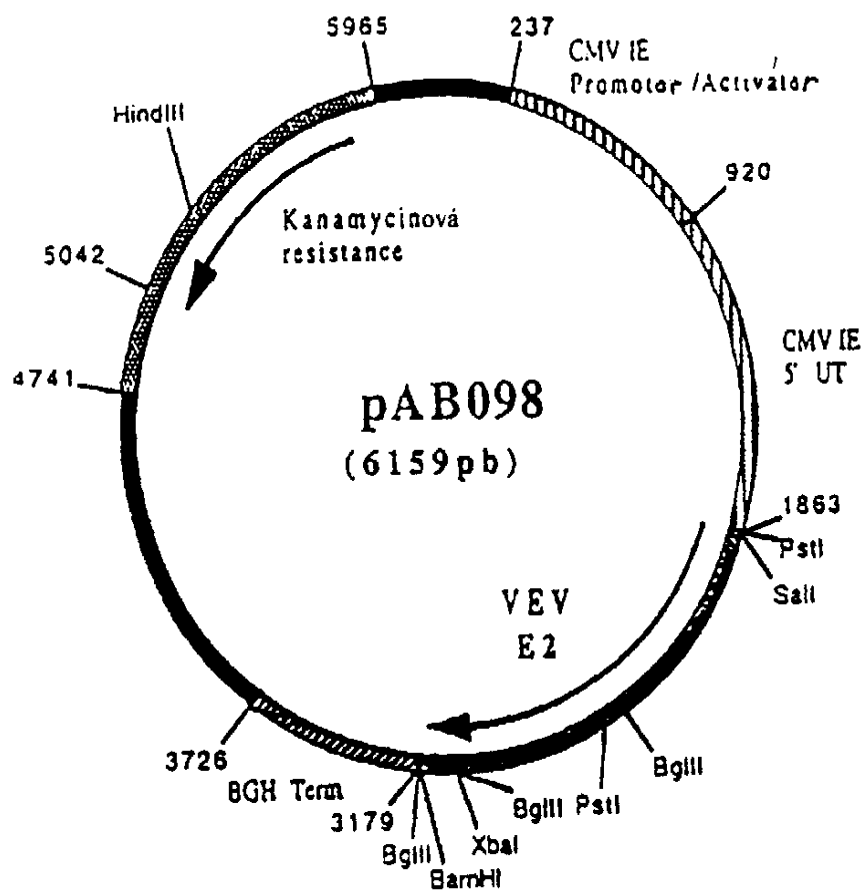
Obr. 15



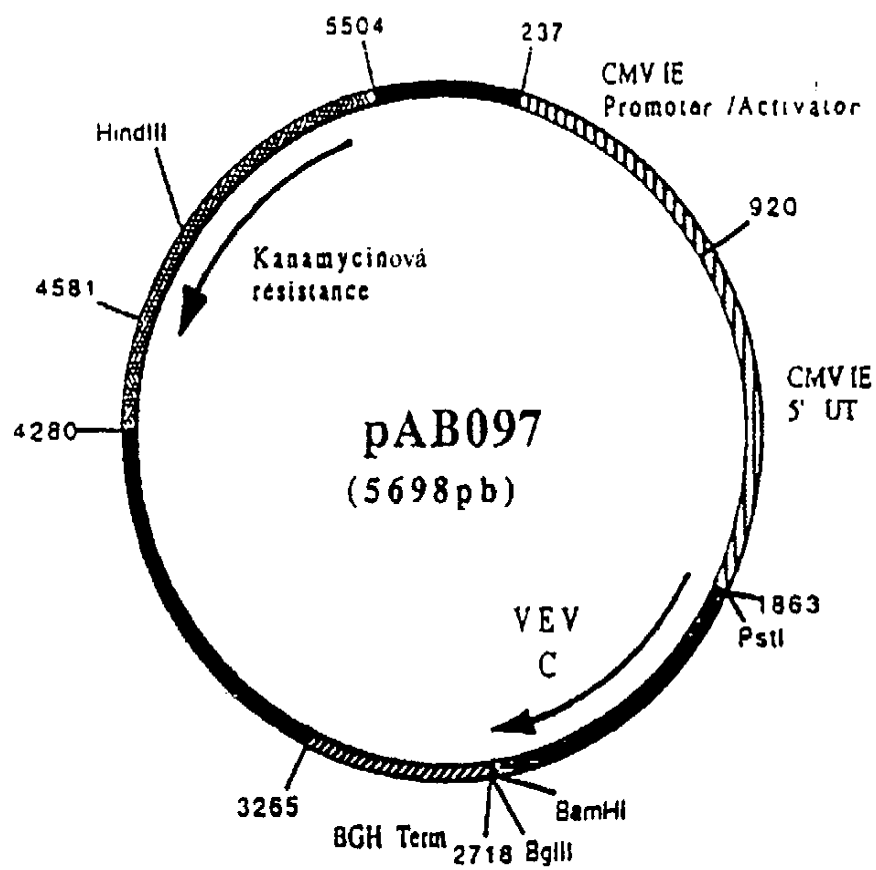
Obr. 16



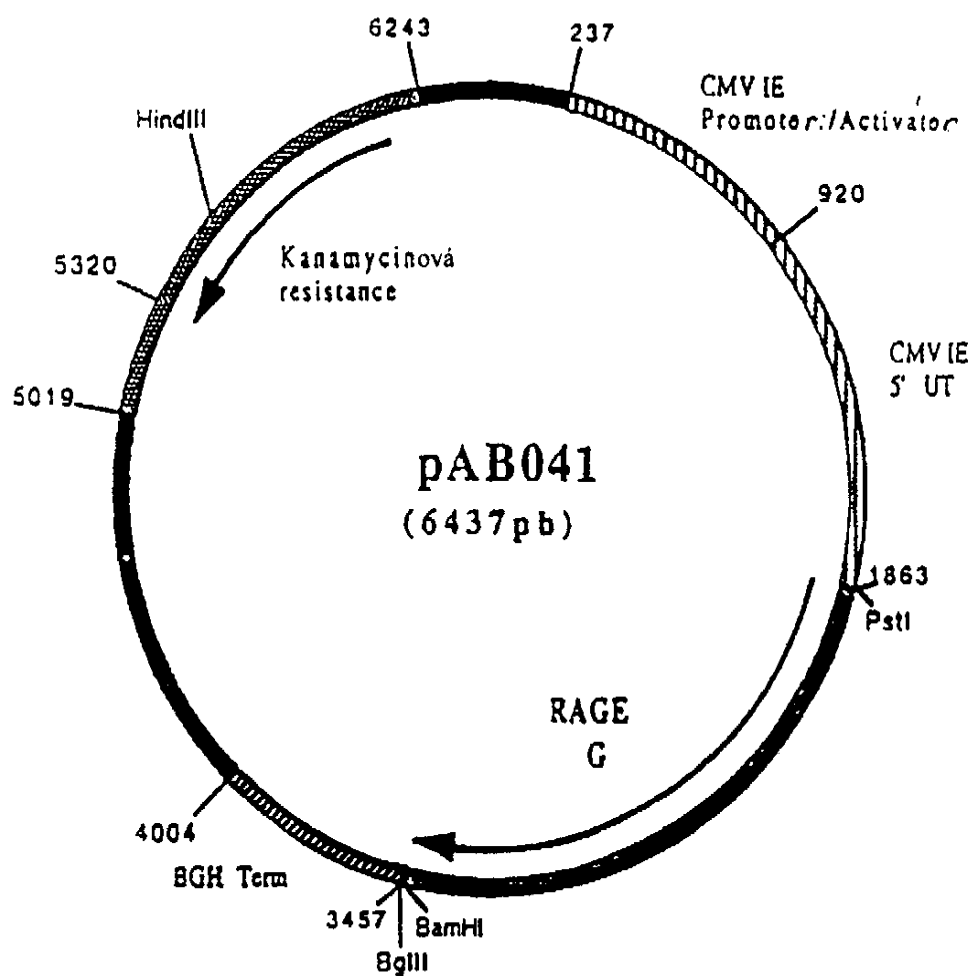
Obr. 17



Obr. 18



Obr. 19



Obr. 20

Konec dokumentu
