

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-159**
(22) Přihlášeno: **15.07.1997**
(30) Právo přednosti: **19.07.1996 FR 1996/9609337**
(40) Zveřejněno: **16.06.1999**
(Věstník č. 6/1999)
(47) Uděleno: **12.10.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **21.11.2007**
(Věstník č. 47/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/FR1997/001315**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/003660**

(11) Číslo dokumentu:

298 613

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/48 (2006.01)
C12N 15/35 (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
C12N 15/38 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/49 (2006.01)
C12N 15/47 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 95/20660; WO 96/06934.

Wardley, R.C. et al.: The use of feline herpesvirus and baculovirus as vaccine vectors for gag and env genes of feline leukemia virus. J. Gen. Virol., Vol. 73, 1811-1818, 1992.

(73) Majitel patentu:

MERIAL, Lyon, FR

(72) Původce:

Audonnet Jean-Christophe, Lyon, FR

Bouchardon Annabelle, Lyon, FR

Baudu Philippe, Craaponne, FR

Riviere Michel, Ecully, FR

(74) Zástupce:

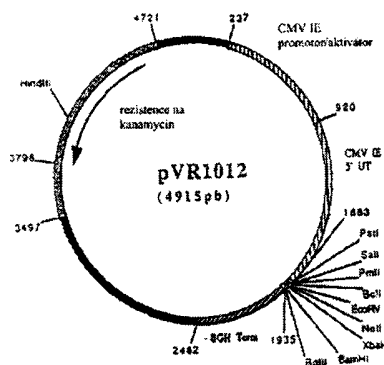
TRAPLOVÁ HAKR KUBÁT Advokátní a patentová
kancelář, Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Vakcína pro kočky obsahující nukleové
kyseliny kódující geny viru kočičí leukémie**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje vakcínu pro kočky, která obsahuje plazmid exprimující in vivo jednu nebo několik nukleových kyselin kódujících env a/nebo gag/pol viru kočičí leukémie a vhodné pomocné látky. Dále poskytuje očkovací soupravu pro kočky, která obsahuje společně vakcínu podle vynálezu a další vakcínu pro kočky.



CZ 298613 B6

Vakcína pro kočky obsahující nukleové kyseliny kódující geny viru kočičí leukémie

Oblast techniky

5

Vynález se týká vakcíny umožňující vakcinaci koček proti virové kočičí leukémii. Vynález se dále týká soupravy pro takovou vakcinaci.

10

Dosavadní stav techniky

V minulosti byly již navrženy sdružené vakcíny proti různým virům koček.

15

Sdružené vakcíny byly dosud uskutečňovány tak, že se vycházelo z neaktivních nebo ze živých vakcín a případně ze směsi takových vakcín. Jejich příprava představuje problémy s kompatibilitou mezi vakcínami a se stabilitou. Ve skutečnosti je třeba zajistit kompatibilitu mezi různými složkami vakcín, aby neobsahovala různé použité antigeny a formulace, zejména v případě, kde se kombinují inaktivní vakcíny a vakcíny živé. Dále jsou zde problémy a konzervací takových složených vakcín a také problém jejich neškodnosti, zejména v přítomnosti adjuvans. Tyto vakcíny jsou obecně dosti nákladné.

20

Příhlášky vynálezu WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 a WO-A-95 20660 používají dříve vyvinuté techniky polynukleotidových vakcín. Je známo, že tyto vakcíny užívají plazmidové konstrukty pro expresi antigenu uloženého v plazmidu v buňkách hostitele. Byly navrženy všechny způsoby podávání (intraperitoneální, intravenózní, intramuskulární, transkutánní, intradermální, mukózní atd.). Mohou být rovněž použity různé prostředky vakcinace, jako nanesení DNA na povrch částíček zlata a nastřelování tak, aby pronikly pokožkou zvířete (Tang a kol., Nature 356, 152-154, 1992) a injekční stříkačky na proud kapaliny umožňující proniknutí do pokožky, svalů, tukových tkání a tkání prsu (Furth a kol., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

30

V polynukleotidových vakcínách se mohou užívat holé DNA nebo DNA vázané na liposomy nebo kationtové lipidy.

35

Cílem vynálezu bylo vytvořit formulace vícesložkové vakcíny umožňující zajištění vakcinace proti některým virovým chorobám koček.

Dalším cílem vynálezu je vytvořit takovou formulaci vakcíny sdružující různé složky zachovávající všechna požadovaná kritéria snášenlivosti mezi jejími složkami a jejich stability.

40

Dalším cílem vynálezu je vytvořit formulaci vakcíny umožňující sdružit různé složky v témže nosiči.

Dalším cílem vynálezu je vytvořit takovou vakcínu, jejíž výroba by byla jednoduchá a levná.

45

Dále se vynález týká způsobu vakcinace koček, který umožňuje významné zvýšení účinnosti vakcíny a je neškodný.

50

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje vakcínu určenou pro kočky, která obsahuje plazmid obsahující a exprimující in vivo jednu nebo několik nukleových kyselin kódujících env a/nebo gag/pol viru kočičí leukémie (FeLV) a vhodné pomocné látky.

55

Výraz „složka“ použitý v této přihlášce vynálezu značí alespoň jeden antigen zajišťující ochranu proti určitému viru patogenu, přičemž složka může obsahovat jako podsložky jeden nebo několik genů přirozených nebo modifikovaných určitého patogenu.

- 5 Výraz „gen“ patogenního činidla značí nejen úplný gen, nýbrž také různé sekvence nukleotidů včetně fragmentů se zachovanou schopností indukce ochranné odpovědi. Pojem genu obsahuje sekvence nukleotidů ekvivalentní těm, které jsou přesně popsány v příkladech, to znamená různé sekvence, avšak kódující stejný protein. Zahrnuje také sekvence nukleotidů jiných kmenů daného patogenu, zajišťující zkříženou ochranu nebo specifickou ochranu kmene nebo skupin kmenu.
- 10 Zahrnuje ještě sekvence nukleotidů, které byly modifikovány pro usnadnění exprese in vivo hostitelským zvířetem, avšak kódující tentýž protein.

Různé složky jsou obsaženy ve vakcinační formulaci podle vynálezu v terapeuticky účinném množství.

- 15 Vakcína v provedení podle předloženého vynálezu obsahuje geny env a gag/pro viru leukémie koček ve stejném plazmidu nebo v různých plazmidech nebo samotný gen env.

- Podle dalšího výhodného provedení předloženého vynálezu formulace vakcíny obsahuje oba
- 20 geny env a gag/pro v různých plazmidech nebo v témže plazmidu nebo v jediném z těchto genů.

Podle dalšího výhodného provedení předloženého vynálezu formulace vakcíny obsahuje 10 ng až 1 mg, přednostně 100 ng až 500 µm a s výhodou 1 µg až 250 µg každého plazmidu.

- 25 Vynález dále poskytuje použití jednoho nebo několika výše zmíněných plazmidů pro výrobu vakcíny určené k vakcinaci koček primárně vakcínovaných první vakcínou zvolenou ze skupiny obsahující celou živou vakcínu, celou inaktivovanou vakcínu, podjednotkovou vakcínu, rekombinantní vakcínu, přičemž tato první vakcína představuje antigen nebo antigeny kódované plazmidem nebo plazmidy nebo antigeny zajišťující zkříženou ochranu.

- 30 Vynález dále poskytuje soupravu obsahující vakcínu pro kočky seskupující formulace vakcíny zvolenou ze skupiny obsahující celou živou vakcínu, celou inaktivovanou vakcínu, podjednotkovou vakcínu, rekombinantní vakcínu, přičemž první vakcína představuje antigen kódovaný polynukleotidovou vakcínou nebo antigen zajišťující zkříženou ochranu pro podávání druhé vakcíny
- 35 v primární vakcinaci a pro revakcinaci a formulaci vakcíny.

- Vynález se dále týká vakcíny definované výše doplněné poznámkou oznamující, že tato formulace je použitelná pro vyvolání první vakcíny pro kočky zvolenou ze skupiny obsahující celou živou vakcínu, celou inaktivovanou vakcínu, podjednotkovou vakcínu, rekombinantní vakcínu,
- 40 přičemž tato první vakcína představuje antigen kódovaný polynukleotidovou vakcínou nebo antigen zajišťující zkříženou ochranu.

- Následující obrázky, sekvence a příklady slouží k ilustraci a lepšímu pochopení předloženého vynálezu. Jen část z nich bezprostředně dokládá předmět, pro který je požadována patentová
- 45 ochrana. Odborník rozpozná, že ostatní mají funkci doplňkovou a ilustrační.

Přehled obrázků na výkresech

- 50 Obr. 1 Plazmid pVR1012
Obr. 2 Plazmid pPB179
Obr. 3 Sekvence genu env FeLV-B
Obr. 4 Plazmid pPB180

Obr. 5 Sekvence gag/pol viru FeLV–A kmene Glasgow–1

Obr. 6 Plazmid pPB181

Obr. 7 Plazmid pAB009

Obr. 8 Plazmid pAB053

5 Obr. 9 Plazmid pAB052

Obr. 10 Plazmid pAB056

Obr. 11 Plazmid pAB02S

Obr. 12 Plazmid pAB029

Obr. 13 Plazmid pAB010

10 Obr. 14 Plazmid pAB030

Obr. 15 Plazmid pAB083

Obr. 16 Plazmid pAB041

Seznam sekvencí SEQ ID č.

15

SEQ ID č.1 Oligonukleotid PB247

SEQ ID č.2 Oligonukleotid PB249

SEQ ID č.3 Oligonukleotid PB281

SEQ ID č.4 Oligonukleotid PB282

20

SEQ ID č.5 Sekvence genu env viru FeLV–B

SEQ ID č.6 Oligonukleotid PB283

SEQ ID č.7 Oligonukleotid PB284

SEQ ID č.8 Sekvence genu gag/pol viru FeLV–A (Glasgow–1)

SEQ ID č.9 Oligonukleotid AB021

25

SEQ ID č.10 Oligonukleotid AB024

SEQ ID č.11 Oligonukleotid AB103

SEQ ID č.12 Oligonukleotid AB112

SEQ ID č.13 Oligonukleotid AB113

SEQ ID č.14 Oligonukleotid AB104

30

SEQ ID č.15 Oligonukleotid AB101

SEQ ID č.16 Oligonukleotid AB102

SEQ ID č.17 Oligonukleotid AB106

SEQ ID č.18 Oligonukleotid AB107

SEQ ID č.19 Oligonukleotid AB061

35

SEQ ID č.20 Oligonukleotid AB064

SEQ ID č.21 Oligonukleotid AB065

SEQ ID č.22 Oligonukleotid AB066

SEQ ID č.23 Oligonukleotid AB025

SEQ ID č.24 Oligonukleotid AB026

	SEQ ID č.25	Oligonukleotid AB067
	SEQ ID č.26	Oligonukleotid AB070
	SEQ ID č.27	Oligonukleotid AB154
	SEQ ID č.28	Oligonukleotid AB155
5	SEQ ID č.29	Oligonukleotid AB011
	SEQ ID č.30	Oligonukleotid AB012

Příklady provedení vynálezu

10

Příklad 1: Kultivace viru

Viry se kultivují na vhodném buněčném systému až po dosažení cytopatického efektu. Buněčné systémy použitelné pro určitý virus jsou odborníkům dobře známé. Buňky citlivé na použitý virus, kultivované v minimálním esenciálním médiu podle Eagleho (médiu „MEM“) nebo v jiném vhodném médiu jsou naočkovány vyšetřovaným virovým kmenem při multiplicitě infekce 1. Infikované buňky jsou potom inkubovány při 37 °C po dobu nutnou pro objevení úplného cytopatického efektu (průměrně za 36 hodin).

20

Příklad 2: Extrakce virové genomové DNA

Po kultivaci jsou supernatanty a lyzované buňky sklizeny a celková virová suspenze se centrifuguje při 1000 g po dobu 10 minut a při teplotě +4 °C pro eliminaci buněčného odpadu. Virové částice jsou potom sklizeny ultracentrifugací při 400 000 g po dobu 1 hodiny a při teplotě +4 °C. Sediment je resuspendován v minimálním objemu pufru (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Tato koncentrovaná virová suspenze se zpracuje proteinázou K (konečných 100 µg/ml) za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) (0,5 x konečných) po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Virová DNA se potom extrahuje směsí fenolu a chloroformu, potom se vysráží se 2 objemy absolutního ethanolu. Po stání přes noc při 20 °C se DNA centrifuguje při 10 000 g po dobu 15 minut při teplotě +4 °C. Sediment DNA se usuší, potom se rozpustí v minimálním objemu ultračisté sterilní vody. Potom může být DNA štěpena restričními enzymy.

35

Příklad 3: Izolace virové genomové RNA

RNA viry byly vyčištěny technikami dobře známými odborníkům. Virová genomová RNA každého viru byla potom izolována pomocí metody užívající „guanidiumthiokyanát/fenolchloroform“ popsané autorem P. Chomczynski a N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 162, 156–159).

40

Příklad 4: Techniky molekulární biologie

Všechny konstrukce plazmidů byly realizovány použitím standardních technik molekulární biologie popsaných autory Sambrook a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. vydání. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 1989). Všechny restriční fragmenty použité pro předložený vynález byly izolovány použitím soupravy „Geneclean“ (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

50

Příklad 5: Technika RT-PCR

Specifické oligonukleotidy (obsahující na svých koncích restrikční místa pro usnadnění klonování namnožených fragmentů) byly syntetizovány tak, že úplně pokrývají kódující oblasti genů, které mají být amplifikovány (viz specifické příklady). Reakce reverzního přepisu (RT) a amplifikace v řetězové polymerázové reakci (PCR) byly provedeny standardní technikou (Sambrook J. a kol. 1989). Každá reakce RT-PCR byla provedena s dvojicí specifických amplimerů, přičemž jako matrice byla použita extrahovaná virová genomová RNA. Amplifikovaná komplementární DNA byla extrahována směsí fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu (25:24:1) než byla rozštěpena restrikčními enzymy.

Příklad 6: Plazmid pVR1012

Plazmid pVR1012 (obr. 1) byl získán od společnosti Vical Inc. San Diego, CA, USA. Jeho konstrukci popsali autoři J. Hartikka a kol. (Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205–1217).

Příklad 7: Konstrukce plazmidu pPB179 (gen ENV viru FeLV-A)

Reakce RT-PCR technikou podle příkladu 5 byla provedena s genomovou RNA viru leukémie koček (FeLV-A) (kmen Glasgow-1) (N. Stewart a kol. J. Virol, 1986, 58, 825–834), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

PB247 (29 mer) (SEQ ID č. 1)

5' TTTGTCGACCATGGAAAGTCCAACGCACC 3'

PB249 (28 mer) (SEQ ID č. 2)

5' TTTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCG 3'

pro amplifikaci fragmentu 1943 bp obsahujícího gen kódující glykoprotein env viru FeLV-A (kmen Glasgow-1) ve formě fragmentu Sall-BamHI. Po vyčištění byl produkt RT-PCR rozštěpen Sall a BamHI pro izolaci fragmentu Sall-BamHI o velikosti 1935 bp. Fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6) předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pPB179 (6804 bp) (obr. 2).

Příklad 8: Konstrukce plazmidu pPB180 (gen ENV viru FeLV-B)

Reakce RT-PCR technikou podle příkladu 5 byla provedena a genomovou RNA viru leukémie koček (podtyp FeLV-B), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

PB281 (29 mer) (SEQ ID č. 3)

5' TTTGTCGACATGGAAGGTCCAACGCA000 3'

PB282 (32 mer) (SEQ ID č. 4)

5' TTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCATATTG 3'

pro amplifikaci fragmentu 2005 bp obsahujícího gen kódující glykoprotein env viru FeLV-B (obr. 3 a SEQ ID č. 5) ve formě fragmentu Sall a BamHI pro získání fragmentu Sall-BamHI o velikosti 1995 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pPB180 (6863 bp) (obr. 4).

Příklad 9: Konstrukce plazmidu pPB181 (gen FeLV gag/pol)

5 Reakce RT-PCR technikou podle příkladu 5 byla provedena a genomovou RNA viru leukémie koček (podtyp FeLV-A) (kmen Glasgow-1), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

PB283 (33 mer) (SEQ ID č. 6)

5' TTGTCGACATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAG 3'

PB284 (40 mer) (SEQ ID č. 7)

5' TTGGATCCTTATTTAATTACTGCAGTTCCAAGGAAGTCTC 3'

10 pro amplifikaci fragmentu 3049 bp obsahujícího sekvenci kódující protein gag a část 5' sekvence kódující protein pol viru FeLV-A (kmen Glasgow-1) (obr. 5 a SEQ ID č. 8) ve formě fragmentu Sall-BamHI. Po vyčištění byl produkt RT-PCR rozštěpen Sall a BamHI pro získání fragmentu Sall-BamHI 3039 bp. Fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6) předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pPB181 (7908 bp) (obr. 6).

15

Příklad 10: Konstrukce plazmidu pAB009 (gen FPV VP2)

20 Reakce PCR byla provedena s genomovou DNA viru panleukopenie koček (kmen 193) (J. Nartyn a kol. J. Gen. Virol. 1990, 71, 2747-2752), připravenou technikou podle příkladu 2 a s těmito oligonukleotidy:

AB021 (34 mer) (SEQ ID č. 9)

5' TGCTCTAGAGCAATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC 3'

AB024 (33 mer) (SEQ ID č. 10)

5' CGCGGATCCATTAATATAATTTTCTAGGTGCTA 3'

25 pro amplifikaci fragmentu 1776 bp obsahujícího gen kódující protein kapsidu VP2 FPV. Po vyčištění byl produkt PCR rozštěpen XbaI a BamHI pro získání fragmentu XbaI-BamHI o velikosti 1764 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného XbaI a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB009 (6664 bp) (obr. 7).

30

Příklad 11: Konstrukce plazmidu pAB053 (gen FIPV S)

35 Reakce RT-PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru peritonické infekce koček (PIF) (kmen 79-1146) (R. de Groot a kol. J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB103 (38 mer) (SEQ ID č. 11)

5' ATAAGAATGCGGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

AB112 (25 mer) (SEQ ID č. 12)

5' CGTACATGTGGAATCCACTGGTTG 3'

40 po amplifikaci sekvence části 5' genu kódujícího glykoprotein S viru ve formě fragmentu NotI-EcoRI. Po vyčištění byl produkt RT-PCR 492 bp rozštěpen NotI a EcoRI pro uvolnění fragmentu

NotI–EcoRI o velikosti 467 bp (fragment A). Plazmid pJCA089 (příhláška vynálezu PCT/FR95/101128) byl rozštěpen EcoRI a SpeI pro uvolnění fragmentu 3378 bp obsahujícího střední část genu kódujícího modifikovaný glykoprotein S viru PIF (fragment B).

- 5 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru PIF (kmen 79–1146), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB113 (25 mer) (SEQ ID č. 13)

5'AGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTG 3'

AB104 (37 mer) (SEQ ID č. 14)

5'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGGACATGCACTTTTTC 3'

- 10 pro amplifikaci sekvenční části 3' genu kódujícího glykoprotein S viru PIF ve formě fragmentu SpeI–NotI. Po vyčištění byl produkt RT–PCR o velikosti 543 bp rozštěpen SpeI a NotI pro uvolnění fragmentu SpeI–NotI o velikosti 519 bp (fragment C). Fragmenty A, B a C byly potom společně ligovány vektorem pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného NotI pro získání plazmidu pAB053 (9282 bp), který obsahuje gen S modifikovaný v dobré orientaci vzhledem k promotoru
15 (obr. 8).

Příklad 12: Konstrukce plazmidu pAB052 (gen FIPV M)

- 20 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru peritoneální infekce koček (PIF) (kmen 79–1146) (H. Vennema a kol. Virology, 1191, 181, 327–335), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB101 (37 mer) (SEQ ID č. 15)

5'ACGCGTCGACCCACCATGAAGTACATTTTGCTAATAC 3'

AB102 (36 mer) (SEQ ID č. 16)

5'CGCGGATCCTTACACCATATGTAATAATTTTTCATG 3'

- 25 pro přesnou izolaci genu kódujícího glykoprotein N viru PIF ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění byl produkt RT–PCR o velikosti 812 bp rozštěpen Sall a BamHI pro uvolnění fragmentu Sall–BamHI o velikosti 399 bp. Tento fragment byl potom ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI pro získání plazmidu pAB052 (5668 bp) (obr. 9).
30

Příklad 13: Konstrukce plazmidu pAB056 (gen FIPV N)

- 35 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru peritoneální infekce koček (PIF) (kmen 79–1146) (Vennema a kol. Virology, 181, 323–335), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB106 (35 mer) (SEQ ID č. 17)

5'ACGCGTCGACGCCATGGCCACACAGGGACAACGCG 3'

AB107 (36 mer) (SEQ ID č. 18)

5'CGCGGATCCTTAGTTTCGTAACCTCATCAATCATCTC 3'

pro přesnou izolaci genu kódujícího protein N viru PIF ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění byl produkt RT–PCR o velikosti 1156 bp rozštěpen Sall a BamHI pro uvolnění fragmentu Sall–BamHI o velikosti 799 bp, potom ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB056 (6011 bp) (obr. 10).

5

Příklad 14: Konstrukce plazmidu pAB028 (gen FHV gB)

10 Reakce PCR byla provedena s genomovou DNA herpesviru koček (FHV–1) (kmen C27) (S. Spetz a kol. Virology, 1993, 197, 125–136), připravenou technikou podle příkladu 2 a s těmito oligonukleotidy:

AB061 (36 mer) (SEQ ID č. 19)

5'AAAACTGCAGAATCATGTCCACTCGTGGCGATCTTG 3'

AB064 (40 mer) (SEQ ID č. 20)

5'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGACAAGATTTGTTTCAGTATC 3'

15 pro amplifikaci fragmentu 2856 bp obsahujícího gen kódující glykoprotein gB viru FHV–1 ve formě fragmentu PstI–NotI. Po vyčištění byl produkt PCR rozštěpen PstI a NotI pro získání fragmentu PstI–NotI o velikosti 2823 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného PstI a NotI, čímž byl získán plazmid pAB028 (7720 bp) (obr. 11).

20

Příklad 15: Konstrukce plazmidu pAB029 (gen FHV gD)

25 Reakce PCR byla provedena s genomovou DNA herpesviru koček (FHV–1) (kmen C–27) (S. Spatz a kol. J. Gen. Virol. 1994, 75, 1235–1244), připravenou technikou podle příkladu 2 a s těmito oligonukleotidy:

AB065 (36 mer) (SEQ ID č. 21)

5'AAAACTGCAGCCAAGATGACACGTCTACATTTTTT 3'

AB066 (33 mer) (SEQ ID č. 22)

5'GGAAGATCTTTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT 3'

30 pro amplifikaci genu kódujícího glykoprotein gD viru FHV–1 ve formě fragmentu PstI–BglII. Po vyčištění byl produkt PCR 1147 bp rozštěpen PstI a BglII pro izolaci fragmentu PstI–BglII o velikosti 1129 bp. Fragment byl potom ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného PstI a BglII, čímž byl získán plazmid pAB029 (5982 bp) (obr. 12).

35

Příklad 16: Konstrukce plazmidu pAB010 (gen FCV C)

Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA kaliciviru koček (FCV) (kmen F9) (M. Carter a kol. Virology, 1992, 190, 443–448), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

40

AB025 (33 mer) SEQ ID č. 23)

5'ACGCGTCGACGCATGTGCTCAACCTGCGCTAAC 3'

AB026 (31 mer) (SEQ ID č. 24)

5'CGCGGATCCTCATAACTTAGTCATGGGACTC 3'

5 pro izolaci genu kódujícího kapsidový protein viru FCV ve formě fragmentu Sall–BamHI. Po vyčištění byl produkt RT–PCR 2042 bp rozštěpen Sall a BamHI pro izolaci fragmentu Sall–BamHI o velikosti 2029 bp. Fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB010 (6892 bp) (obr. 13).

10 Příklad 17: Konstrukce plazmidu pAB030 (gen FIV env)

Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru imuno-deficience koček (FIV) (kmen Petaluma) (R. Olmsted a kol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 8088–8096), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB067 (36 mer) (SEQ ID č. 25)

5'AAACTGCAGAAGGAATGGCAGAAGGATTTGCAGCC 3'

AB070 (36 mer) (SEQ ID č. 26)

15 5'CGCGGATCCTCATTCCTCCCTTTTTCAGACATGCC 3'

20 pro amplifikaci fragmentu 2592 bp obsahujícího gen kódující glykoprotein env viru FIV (kmen Petaluma) ve formě fragmentu PstI–BamHI. Po vyčištění byl produkt RT–PCR rozštěpen PstI a BamHI pro získání fragmentu PstI–BamHI 2575 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pV1012 (příklad 6) předtím rozštěpeného PstI a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB030 (7436) (obr. 14).

25 Příklad 18: Konstrukce plazmidu pAB083 (gen FIV gag/pro)

Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru imuno-deficience koček (FIV) (kmen Petaluma) (R. Olmsted a kol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 8088–8096), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB154 (32 mer) (SEQ ID č. 27)

5'ACGCGTCGACATGGGGAATGGACAGGGGCGAG 3'

AB155 (33 mer) (SEQ ID č. 28)

30 5'TGAAGATCTTCACTCATCCCCTTCAGGAAGAGC 3'

35 pro amplifikaci fragmentu 4638 bp obsahujícího gen kódující proteiny Gag a Pro viru FIV (kmen Petaluma) ve formě fragmentu Sall–BglII. Po vyčištění byl produkt RT–PCR rozštěpen Sall a BglII pro získání fragmentu Sall–BglII o velikosti 4622 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BglII, čímž byl získán plazmid pAB083 (7436 bp) (obr. 15).

Příklad 19: Konstrukce plazmidu pAB041 (gen G viru vztekliny)

- 5 Reakce RT-PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru vztekliny (kmen ERA) (A. Anilionis a kol. *Nature*. 1981, 294, 275–278), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

AB011 (33 mer) (SEQ ID č. 29)

5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID č. 30)

5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

- 10 pro amplifikaci fragmentu 1589 bp obsahujícího gen kódující glykoprotein G viru vztekliny. Po vyčištění byl produkt RT-PCR rozštěpen PstI a BamHI pro získání fragmentu PstI–BamHI o velikosti 1578 bp. Tento fragment byl ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného PstI a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB041 (6437 bp) (obr. 16).

- 15 Příklad 20: Příprava a čištění plazmidů

- Pro přípravu plazmidů určených pro vakcinaci zvířat je možno použít všechny techniky umožňující získat suspenzi plazmidů vyčištěných převážně ve formě nadšroubovic. Tyto techniky jsou odborníkům dobře známy. Lze uvést zejména techniku alkalické lyze následovanou dvěma po sobě jdoucími ultracentrifugacemi na gradientu chloridu cesného za přítomnosti etidiumbromidu, jak popisuje např. J. Sambrook a kol. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. vydání. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 1989). Rovněž je možno odkázat na PCT přihlášky vynálezu WO 95/21250 a WO 96/02658, které popisují způsob průmyslové výroby plazmidů použitelných pro vakcinaci. Pro potřebu výroby vakcín (viz příklad 17), se vyčištěné plazmidy resuspendují tak, aby se získal roztok s vysokou koncentrací (>2 mg/ml) způsobilý ke skladování. Pro tento úhel se plazmidy resuspendují buď v ultračisté vodě, nebo v pufru TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

- 30 Příklad 21: Průmyslová výroba sdružených vakcín

- Různé plazmidy nutné pro průmyslovou výrobu sdružené vakcíny se smíchají při použití jejich koncentrovaných roztoků (příklad 16). Směsi jsou vytvořeny takovým způsobem, aby konečná koncentrace každého plazmidu odpovídala účinné dávce každého plazmidu. Roztoky použitelné pro nastavení konečné koncentrace vakcíny mohou být buď roztok 0,9% NaCl, nebo pufr PBS. Zvláštní formulace, jako liposomy a kationtové lipidy, mohou být také použity pro výrobu vakcín.

- 40 Příklad 22: Vakcinace koček

- Kočky se vakcinují dávkami 10 µg, 50 µg nebo 250 µg pro jeden plazmid. Injekce se podávají intramuskulárním způsobem. V těchto případech se dávky vakcíny podávají v objemu 1 ml. Injekce také mohou být podávány intradermálním způsobem. V takovém případě se dávky vakcíny podávají v celkovém objemu 1 ml podávaném v 10 dílčích dávkách po 0,1 ml nebo ve 20 dávkách po 0,05 ml. Intradermální podávání jsou prováděna po vyholení kůže (ze strany hrudníku) nebo na některé poměrně holé anatomické oblasti, například vnitřní strana stehna.

- 50 Je také možné použít injekční přístroj pro proud kapaliny (bez jehly) pro intradermální injekce.

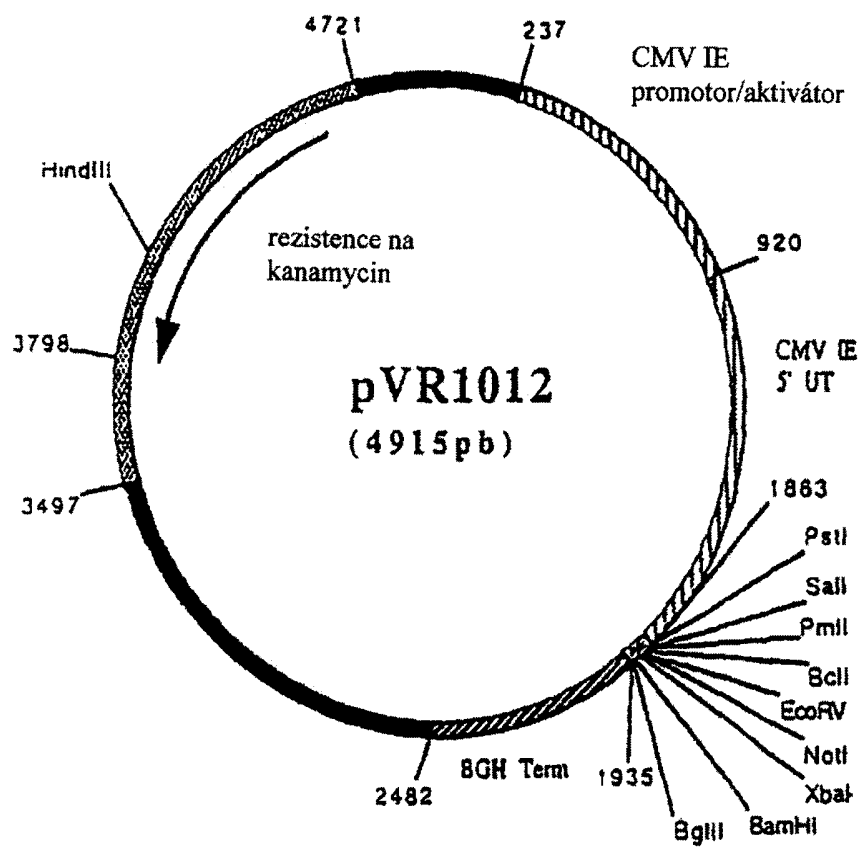
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 **1.** Vakcína pro kočky, **vyznačující se tím**, že obsahuje plazmid obsahující a exprimující in vivo jednu nebo několik nukleových kyselin kódujících env a/nebo gag/pol viru kočičí leukémie a vhodné pomocné látky.
- 10 **2.** Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plazmid obsahuje a exprimuje in vivo nukleovou kyselinu kódující env.
- 3.** Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plazmid obsahuje a exprimuje in vivo nukleovou kyselinu kódující env a gag/pol.
- 15 **4.** Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plazmid obsahuje a exprimuje in vivo nukleovou kyselinu kódujících env, přičemž vakcína obsahuje ještě další plazmid obsahující a exprimující in vivo nukleovou kyselinu kódující gag/pol.
- 20 **5.** Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že plazmid obsahuje promotor vybraný ze skupiny sestávající z: promotoru CMV-IE, časněho SV40 promotoru, pozdního SV40 promotoru, LTR promotoru viru Rousova sarkomu a promotoru genu cytoskeletu.
- 25 **6.** Vakcína podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že plazmid obsahuje promotor CMV-IE.
- 7.** Vakcína podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že promotor genu cytoskeletu je promotor desminu nebo promotor aktinu.
- 30 **8.** Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že obsahuje 10 ng až 1 mg, výhodně 100 ng až 500 µg a výhodněji 1 µg až 250 µg každého plazmidu.
- 35 **9.** Použití jednoho nebo více plazmidů, které jsou popsány v kterémkoliv z nároků 1 až 7, pro výrobu vakcíny určené pro očkování kočky nejdříve očkované pomocí první vakcíny vybrané ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, přičemž první vakcína má antigen či antigeny kódované plazmidem či plazmidy nebo antigen či antigeny poskytující zkříženou ochranu.
- 40 **10.** Očkovací souprava pro kočky, **vyznačující se tím**, že obsahuje společně vakcínu obsahující plazmid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 a další vakcínu pro kočky vybranou ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, přičemž další vakcína má antigen kódovaný vakcínou obsahující plazmid nebo antigen poskytující zkříženou ochranu, a přičemž další vakcína je určena pro podání jako první dávka a vakcína obsahující plazmid jako posilovací dávka.
- 45 **11.** Použití jednoho nebo více plazmidů, které jsou popsány v kterémkoliv z nároků 1 až 7, pro výrobu vakcíny určené pro očkování kočky v kombinaci s inaktivovanou úplnou vakcínou, živou úplnou vakcínou, rekombinantní vakcínou nebo podjednotkovou vakcínou proti jiné nemoci koček.

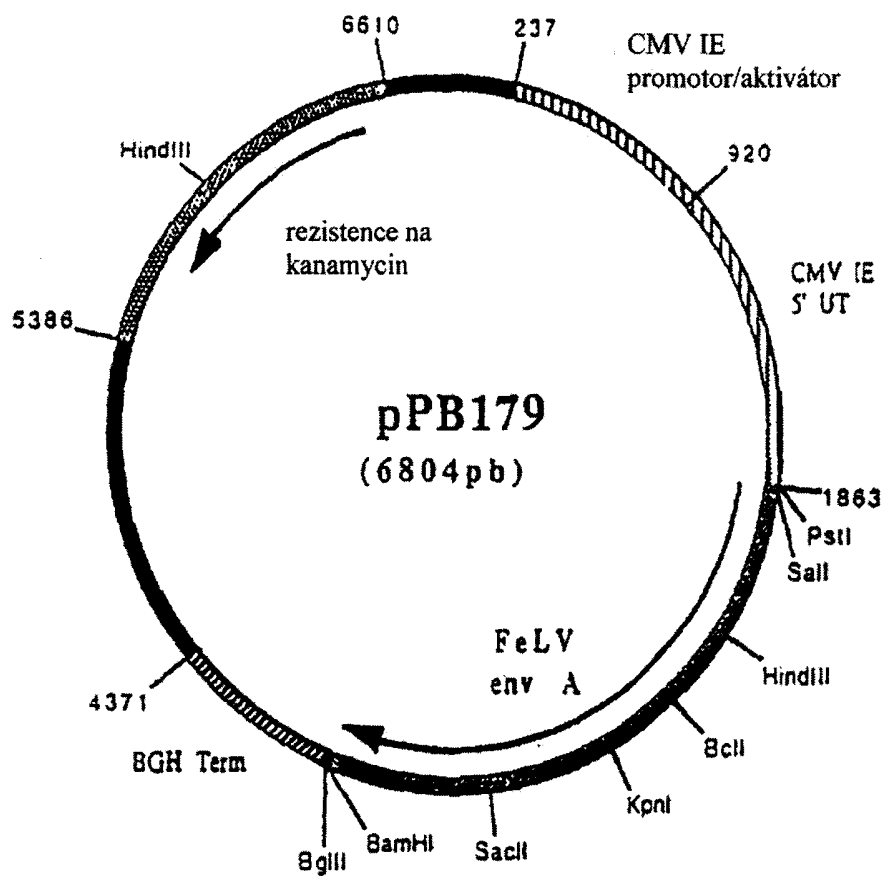
50

19 výkresů

55



Obr. 1



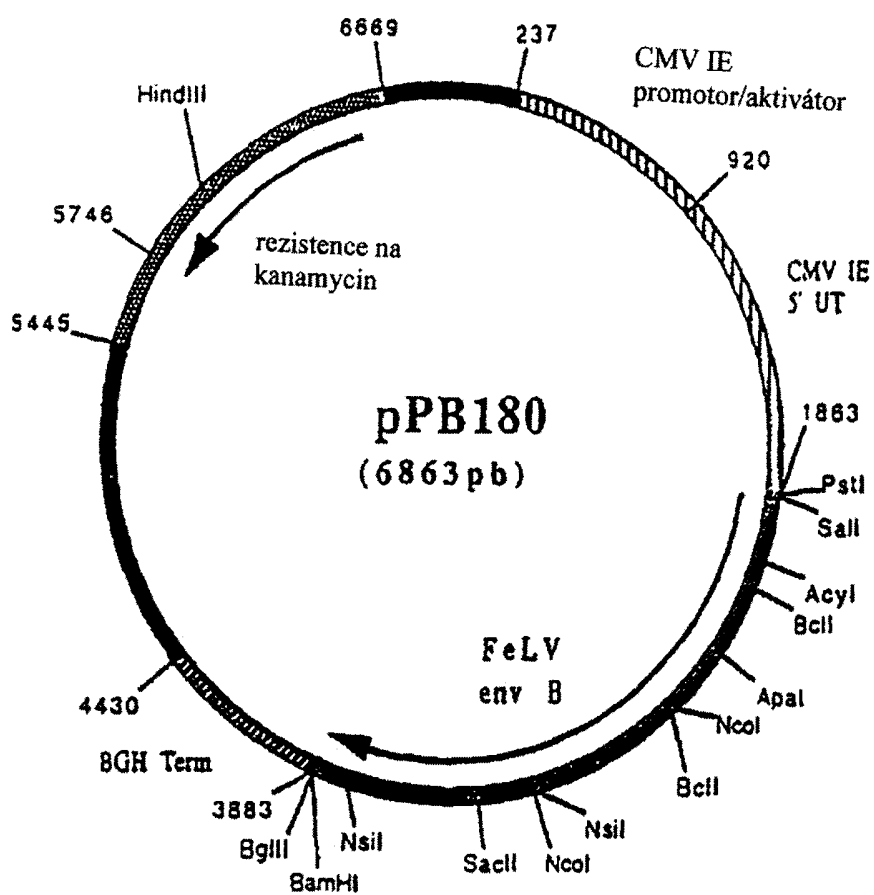
Obr. 2

1 ATGGAAGGTCCAACGCACCCAAAACCCCTCTAAAGATAAGACTTTCTCGTGGGACCTAATGATT
 1> MetGlyGlyProThrHisProLysProSerLysAspLysThrPheSerTrpAspLeuMetIle
 64 CTGGTGGGGGTCTTACTAAGACTGGACGTGGGAATGGCCAATCCTAGTCCGCACCAAATATAT
 22> LeuValGlyValLeuLeuArgLeuAspValGlyMetAlaAsnProSerProHisGlnIleTyr
 127 AATGTAACCTTGGACAATAACCAACCTTGTAACCTGGAACAAAGGCTAATGCCACCTCCATGTTG
 43> AsnValThrTrpThrIleThrAsnLeuValThrGlyThrLysAlaAsnAlaThrSerMetLeu
 190 GGAACCTTGACAGACGCCCTTCCCTACCATGTATTTTGACTTATGTGATATAATAGGAAATACA
 64> GlyThrLeuThrAspAlaPheProThrMetTyrPheAspLeuCysAspIleIleGlyAsnThr
 253 TGGAACCCCTTCAGATCAAGAACCATTCCCAGGGTATGGATGTGATCAGCCTATGAGGAGCTGG
 85> TrpAsnProSerAspGlnGluProPheProGlyTyrGlyCysAspGlnProMetArgArgTrp
 316 CGACAGAGAAACACACCCCTTTTATGTCTGTCCAGGACATGCCAACCGGAAGCAATGTGGGGGG
 106> ArgGlnArgAsnThrProPheTyrValCysProGlyHisAlaAsnArgLysGlnCysGlyGly
 379 CCACAGGATGGGTTCTGCGCTGTATGGGGTTGCGAGACCACCGGGGAAACCTATTGGAGACCC
 127> ProGlnAspGlyPheCysAlaValTrpGlyCysGluThrThrGlyGluThrTyrTrpArgPro
 442 ACCTCCTCATGGGACTACATCACAGTAAAAAAGGGGTTACTCAGGGAATATATCAATGTAGT
 148> ThrSerSerTrpAspTyrIleThrValLysLysGlyValThrGlnGlyIleTyrGlnCysSer
 505 GGAGGTGGTTGGTGTGGGCCCTGTTACGATAAAGCTGTTCACTCCTCGACAACGGGAGCTAGT
 169> GlyGlyGlyTrpCysGlyProCysTyrAspLysAlaValHisSerSerThrThrGlyAlaSer
 568 GAAGGGGGCCGGTGCAACCCCTTGATCTTGCAATTTACCCAAAAGGGAAGACAAACATCTTGG
 190> GluGlyGlyArgCysAsnProLeuIleLeuGlnPheThrGlnLysGlyArgGlnThrSerTrp
 631 GATGGACCTAAGTCATGGGGGCTACGACTATACCGTTCAGGATATGACCCTATAGCCCTGTTC
 211> AspGlyProLysSerTrpGlyLeuArgLeuTyrArgSerGlyTyrAspProIleAlaLeuPhe
 694 TCGGTATCCCGCAAGTAATGACCATTACGCCGCCCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTG
 232> SerValSerArgGlnValMetThrIleThrProProGlnAlaMetGlyProAsnLeuValLeu
 757 CCTGATCAAAAACCCCATCCAGGCAATCTCAAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCATTCC
 253> ProAspGlnLysProProSerArgGlnSerGlnIleGluSerArgValThrProHisHisSer
 820 CAAGGCAACGGAGGCACCCAGGTGTAACCTCTTGTTAATGCCTCCATTGCCCCCTCTACGTACC
 274> GlnGlyAsnGlyGlyThrProGlyValThrLeuValAsnAlaSerIleAlaProLeuArgThr
 883 CCTGTCACCCCGCAAGTCCCAAACGTATAGGGACCGGAAATAGGTTAATAAATTTAGTGCAA
 295> ProValThrProAlaSerProLysArgIleGlyThrGlyAsnArgLeuIleAsnLeuValGln
 946 GGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAACCTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTG
 316> GlyThrTyrLeuAlaLeuAsnAlaThrAspProAsnLysThrLysAspCysTrpLeuCysLeu
 1009 GTTCTCGACCACCTTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACAGCAACCAACAAAC
 337> ValSerArgProProTyrTyrGluGlyIleAlaIleLeuGlyAsnTyrSerAsnGlnThrAsn
 1072 CCCTCCCCATCTGCCTATCTACTCCGCAACATAAGCTAACTATATCTGAGGTGTGAGGGCAA
 358> ProSerProSerCysLeuSerThrProGlnHisLysLeuThrIleSerGluValSerGlyGln
 1135 GGACTGTGCATAGGGACTGTTCTTAAGACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGA
 379> GlyLeuCysIleGlyThrValProLysThrHisGlnAlaLeuCysAsnLysThrGlnGlnGly
 1198 CATACAGGGGCTCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCTGTAACTGGAAGTCT
 400> HisThrGlyAlaHisTyrLeuAlaAlaProAsnGlyThrTyrTrpAlaCysAsnThrGlyLeu

Obr. 3

1261 ACCCATGCATTTCCATGGCAGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTGTGTCTTAATCGAATTA
 421> ThrProCysIleSerMetAlaValLeuAsnTrpThrSerAspPheCysValLeuIleGluLeu
 1324 TGGCCCAGAGTGACCTACCATCAACCCGAATACATTTACACACATTTTCGACAAAGCTGTCAGG
 442> TrpProArgValThrTyrHisGlnProGluTyrIleTyrThrHisPheAspLysAlaValArg
 1387 TTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACCCTTCCCTTATAATGGGAGGACTCACTGTAGGGGGC
 463> PheArgArgGluProIleSerLeuThrValAlaLeuIleMetGlyGlyLeuThrValGlyGly
 1450 ATAGCCCGCGGGGTCGGAACAGGGACTAAAGCCCTCCTTGAACAGCCAGTTCAGACAACTA
 484> IleAlaAlaGlyValGlyThrGlyThrLysAlaLeuLeuGluThrAlaGlnPheArgGlnLeu
 1513 CAAATGGCTATGCACGCAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAATTAGTGCCTTAGAAAAATCC
 505> GlnMetAlaMetHisAlaAspIleGlnAlaLeuGluIleSerIleSerAlaLeuGluLysSer
 1576 CTGACCTCCCTCTCCGAGGTAGTCTTACAAATAGACGGGGCCTAGATATTCTGTTCTTACAA
 526> LeuThrSerLeuSerGluValValLeuGlnAsnArgArgGlyLeuAspIleLeuPheLeuGln
 1639 AAGGGAGGGCTCTGTGCCGCCCTTAAGGAAGAATGCTGCTTCTATGCAGATCACACCGGACTC
 547> LysGlyGlyLeuCysAlaAlaLeuLysGluGluCysCysPheTyrAlaAspHisThrGlyLeu
 1702 GTCAGAGACAATATGGCTAAATTAAGAGAAAGACTGAAACAGCGACAACAACCTGTTTGACTCC
 568> ValArgAspAsnMetAlaLysLeuArgGluArgLeuLysGlnArgGlnGlnLeuPheAspSer
 1765 CAACAGGGATGGTTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCCCCCTGGTTTACAACCTAATTTCTCTCC
 589> GlnGlnGlyTrpPheGluGlyTrpPheAsnLysSerProTrpPheThrThrLeuIleSerSer
 1828 ATTATAGGCCCTTACTAATCCTACTCCTAATTCCTCTTCGGGCCCATGCATCCTTAACCGA
 610> IleIleGlyProLeuLeuIleLeuLeuLeuIleLeuLeuPheGlyProCysIleLeuAsnArg
 1891 TTAGTGCAATTCGTAAAAGACAGAATATCTGTGGTACAAGCCTTAATTTTAAACCAACAGTAC
 631> LeuValGlnPheValLysAspArgIleSerValValGlnAlaLeuIleLeuThrGlnGlnTyr
 1954 CAACAGATACAGCAATATGATCCGGACCGACCATGA
 652> GlnGlnIleGlnGlnTyrAspProAspArgPro...

Obr. 3 - pokračování



Obr. 4

1 ATGCTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAGCCATTGGGGCTCATCTGTTTGGGGTCTCACCTGAATAC
 1> MetSerGlyAlaSerSerGlyThrAlaIleGlyAlaHisLeuPheGlyValSerProGluTyr
 64 AAGTCTTTGATCGGAGACGAGGGAGCCGGACCCCTCAAGGTCTCTTTCTGAGGTTTCATTTTCG
 22> ArgValLeuIleGlyAspGluGlyAlaGlyProSerArgSerLeuSerGluValSerPheSer
 127 GTTTGGTACCAAAGACGCGCGGCACGTCTTGTCAATTTTTGTCTGGTTGCGTCTTTTCTTGTC
 43> ValTrpTyrGlnArgArgAlaAlaArgLeuValIlePheCysLeuValAlaSerPheLeuVal
 190 CCTTGTCTAACCTTTTAAATTGCAGAAACCGTCATGGGCCAAACTATAACTACCCCTTAAGC
 64> ProCysLeuThrPheLeuIleAlaGluThrValMetGlyGlnThrIleThrThrProLeuSer
 251 CTCACCCCTTGATCACTGGTCTGAAGTCCGGGACGAGCCATAATCAAGGTGTCGAGGTCCGG
 85> LeuThrLeuAspHisTrpSerGluValArgAlaArgAlaHisAsnGlnGlyValGluValArg
 316 AAAAAAGAAATGGATTACCTTATGTGAGGCCGAATGGGTGATGATGAATGTGGCTGGCCCCGA
 106> LysLysLysTrpIleThrLeuCysGluAlaGluTrpValMetMetAsnValGlyTrpProArg
 379 GAAGGAACTTTTTCTCTTGATAGCATTTCACAGGTGAAAAGAAGATCTTCGCCCGGGACCA
 127> GluGlyThrPheSerLeuAspSerIleSerGlnValGluLysLysIlePheAlaProGlyPro
 442 TATGGACACCCCGACCAAGTTCCTTACATTACTACATGGAGATCCTTAGCCACAGACCCCCCT
 148> TyrGlyHisProAspGlnValProTyrIleThrThrTrpArgSerLeuAlaThrAspProPro
 505 TCGTGGGTTCGTCCGTTCCTACCCCTCCCAAACCTCCACACCCCTCCCTCAACCTCTTTTCG
 169> SerTrpValArgProPheLeuProProProLysProProThrProLeuProGlnProLeuSer
 568 CCGCAGCCCTCCGCCCCCTTACCTCTTCCCTCTACCCGTTCTCCCAAGCCAGACCCCCC
 190> ProGlnProSerAlaProLeuThrSerSerLeuTyrProValLeuProLysProAspProPro
 631 AAACCGCCTGTGTTACCGCCTGATCCTTCTTCCCTTTAATTGATCTCTTAACAGAAGAGCCA
 211> LysProProValLeuProProAspProSerSerProLeuIleAspLeuLeuThrGluGluPro
 694 CCTCCCTATCCGGGGGGTCACGGGCCACCGCCATCAGGTCTTAGGACCCCAACCGCTTCCCCG
 232> ProProTyrProGlyGlyHisGlyProProProSerGlyProArgThrProThrAlaSerPro
 757 ATTGCAAGCCGGCTAAGGGAACGACGAGAAAACCTGCTGAAGAATCGAAGCCCTCCCTTG
 253> IleAlaSerArgLeuArgGluArgArgGluAsnProAlaGluGluSerGlnAlaLeuProLeu
 820 AGGGAAGGCCCAACAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCTTCAGACTTGTATAACTGG
 274> ArgGluGlyProAsnAsnArgProGlnTyrTrpProPheSerAlaSerAspLeuTyrAsnTrp
 883 AAGTCGCATAACCCCCCTTTCTCCCAAGATCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATT
 295> LysSerHisAsnProProPheSerGlnAspProValAlaLeuThrAsnLeuIleGluSerIle
 946 TTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGACGACTGCCAGCAGCTCTTGCAGGCACCTCTGACAGGC
 316> LeuValThrHisGlnProThrTrpAspAspCysGlnGlnLeuLeuGlnAlaLeuLeuThrGly
 1009 GAAGAAAGGCAAAGGGTCTTCTTGAGGCCCGAAAGCAGGTTCCAGGCGAGGACGGACGGCCA
 337> GluGluArgGlnArgValLeuLeuGluAlaArgLysGlnValProGlyGluAspGlyArgPro
 1072 ACCCAACTACCCAATGTCATTGACGAGACTTTCCCTTGACCCGTCCCAACTGGGATTTTGCT
 358> ThrGlnLeuProAsnValIleAspGluThrPheProLeuThrArgProAsnTrpAspPheAla
 1135 ACGCCCGCAGGTAGGGAGCACCTACGCCTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCCGGG
 379> ThrProAlaGlyArgGluHisLeuArgLeuTyrArgGlnLeuLeuLeuAlaGlyLeuArgGly

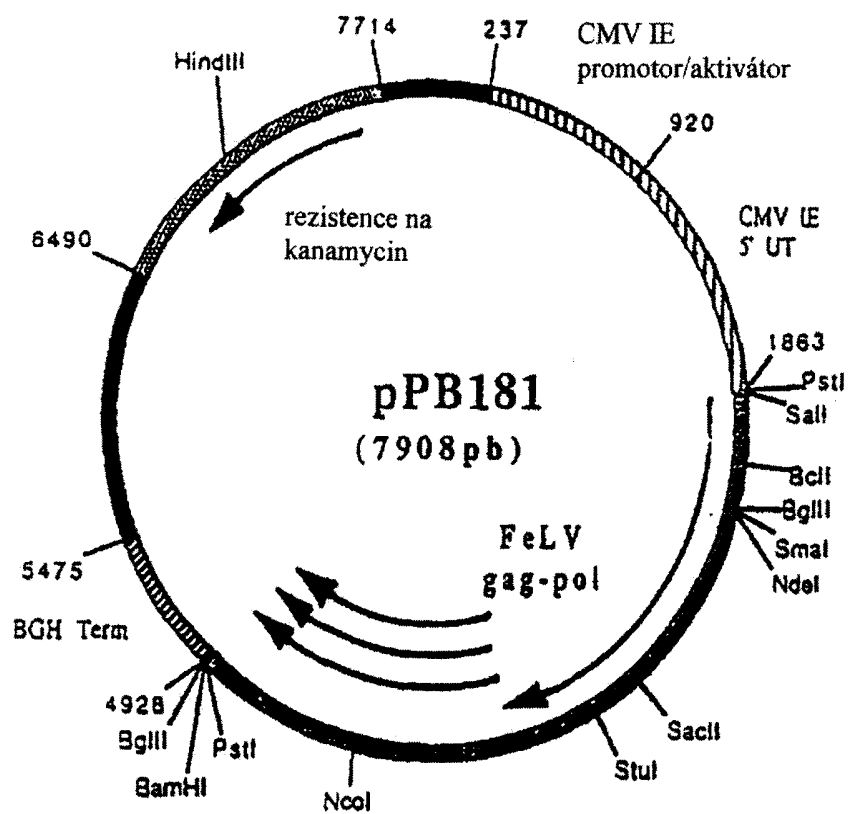
Obr. 5

1193 GCTGCAAGACGCCCCACTAATTTGGCACAGGTAAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAGAGGAAACC
 400> AlaAlaArgArgProThrAsnLeuAlaGlnValLysGlnValValGlnGlyLysGluGluThr
 1251 CCAGCAGCATTTTTAGAAAGATTAAAAGAGGCTTATAGAATGTACACTCCCTATGACCCCTGAG
 421> ProAlaAlaPheLeuGluArgLeuLysGluAlaTyrArgMetTyrThrProTyrAspProGlu
 1324 GACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTATCCTATCCTTTATATACCAGTCTAGCCAGATATAAGA
 442> AspProGlyGlnAlaAlaSerValIleLeuSerPheIleTyrGlnSerSerProAspIleArg
 1387 AATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCTACAAGGGTTCACCCTATCTGATCTGCTAAAAGAGGCA
 463> AsnLysLeuGlnArgLeuGluGlyLeuGlnGlyPheThrLeuSerAspLeuLeuLysGluAla
 1450 GAAAAGATATACAACAAAAGGGAGACCCAGAGGAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCCACAG
 484> GluLysIleTyrAsnLysArgGluThrProGluGluArgGluGluArgLeuTrpGlnArgGln
 1513 GAAGAAAGAGATAAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTCTCTCAG
 505> GluGluArgAspLysLysArgHisLysGluMetThrLysValLeuAlaThrValValAlaGln
 1576 AATAGAGATAAGGATAGAGAAGAAAGTAACTGGGGGATCAAAGGAAAATACCTCTGGGGAAA
 526> AsnArgAspLysAspArgGluGluSerLysLeuGlyAspGlnArgLysIleProLeuGlyLys
 1639 GACCAGTGTGCCTATTGCAAGGAAAAGGGGCATTGGGTTTCGCGATTGCCCCAAACGACCCAGG
 547> AspGlnCysAlaTyrCysLysGluLysGlyHisTrpValArgAspCysProLysArgProArg
 1702 AAGAAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCAACTTAGGAGATTAGGAGAGTCAGGGCCAGGACCCC
 568> LysLysProAlaAsnSerThrLeuLeuAsnLeuGlyAsp...
 1> GluIleArgArgValArgAlaArgThrPr
 1765 CCCCCCTGAGCCAGGATAACCTTAAAAATAGGGGGCAACCGGTGACTTTTCTGGTGGAC
 10> oProProGluProArgIleThrLeuLysIleGlyGlyGlnProValThrPheLeuValAspTh
 1828 GGGAGCCCAGCACTCAGTACTGACTCGACCAGATGGACCTCTCAGTGACCGCACAGCCCTGGT
 31> rGlyAlaGlnHisSerValLeuThrArgProAspGlyProLeuSerAspArgThrAlaLeuVa
 1891 GCAAGGAGCCACGGGAAGCAAAAACCTACCGGTGGACCACCGACAGGAGGGTACAACCTGGCAAC
 52> lGlnGlyAlaThrGlySerLysAsnTyrArgTrpThrThrAspArgArgValGlnLeuAlaTh
 1954 CGGTAAGGTGACTCATTCCTTTTATATGTACCTGAATGTCCCTACCCGTTATTAGGGAGAGA
 73> rGlyLysValThrHisSerPheLeuTyrValProGluCysProTyrProLeuLeuGlyArgAs
 2017 CCTATTAATAAATAAAGGCCAAATCCATTTTACCGGAGAAGGGGCTAATGTTGTTGGGCC
 94> pLeuLeuThrLysLeuLysAlaGlnIleHisPheThrGlyGluGlyAlaAsnValValGlyPr
 2080 CAGGGGTTTACCCCTACAAGTCCTTACTTTACAATTAGAAGAGGAGTATCGGCTATTTGAGCC
 115> oArgGlyLeuProLeuGlnValLeuThrLeuGlnLeuGluGluGluTyrArgLeuPheGluPr
 2143 AGAAAGTACACAAAACAGGAGATGGACACTTGGCTTAAAACTTTCCCCAGGCGTGGGCAGA
 136> oGluSerThrGlnLysGlnGluMetAspThrTrpLeuLysAsnPheProGlnAlaTrpAlaGl

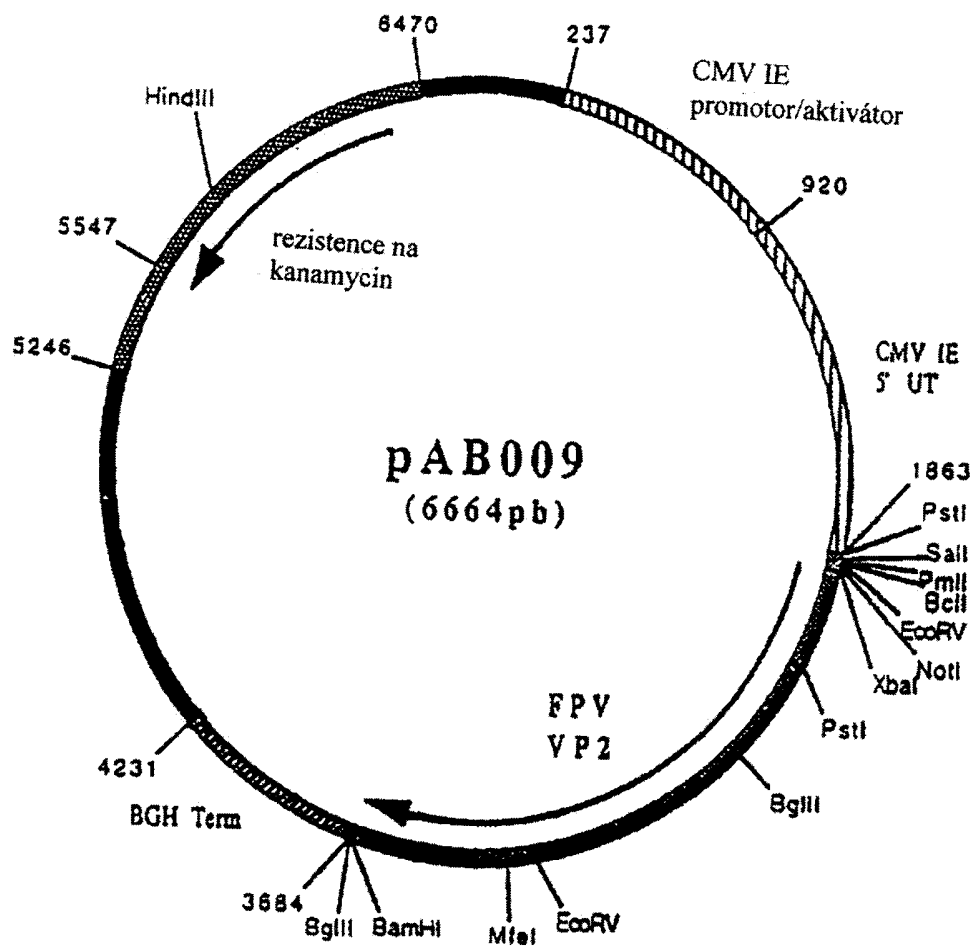
Obr. 5 - pokračování

2256 AACAGGAGGTATGGGAATGGCTCATTGTCAAGCCCCCTTCTCATTCAACTTAAGGCTACTGC
 157> uThrGlyGlyMetGlyMetAlaHisCysGlnAlaProValLeuIleGlnLeuLysAlaThrAl
 2269 CACTCCAATCTCCATCCGACAGTATCCTATGCCCCATGAAGCGTACCAGGGAATTAAGCCTCA
 178> aThrProIleSerIleArgGlnTyrProMetProHisGluAlaTyrGlnGlyIleLysProHi
 2332 TATAAGAAGAATGCTAGATCAAGGCATCCTCAAGCCCTGCCAGTCCCCATGGAATACACCCTT
 199> sIleArgArgMetLeuAspGlnGlyIleLeuLysProCysGlnSerProTrpAsnThrProLe
 2395 ATTACCTGTTAAGAAGCCAGGGACCGAGGATTACAGACCAGTGCAGGACTTAAGAGAAGTAAA
 220> uLeuProValLysLysProGlyThrGluAspTyrArgProValGlnAspLeuArgGluValAs
 2458 CAAAAGAGTAGAAGACATCCATCCTACTGTGCCAAATCCATATAACCTCCTTAGCACCCCTCCC
 241> nLysArgValGluAspIleHisProThrValProAsnProTyrAsnLeuLeuSerThrLeuPr
 2521 GCCGTCTCACCCTTGGTACACTGTCTAGATTTAAAGGACGCTTTTTTCTGCCTGCGACTACA
 262> oProSerHisProTrpTyrThrValLeuAspLeuLysAspAlaPhePheCysLeuArgLeuHi
 2584 CTCTGAGAGTCAGTTACTTTTTGCATTTGAATGGAGAGATCCAGAAATAGGACTGTCAGGGCA
 283> sSerGluSerGlnLeuLeuPheAlaPheGluTrpArgAspProGluIleGlyLeuSerGlyGl
 2647 ACTAACCTGGACACGCCTTCCTCAGGGGTTCAAGAATAGCCCCACCCTATTTGATGAGGCCCT
 304> nLeuThrTrpThrArgLeuProGlnGlyPheLysAsnSerProThrLeuPheAspGluAlaLe
 2710 GCACTCAGACCTGGCCGATTTTCAGGGTAAGGTACCCGGCTCTAGTCCTCCTACAATATGTAGA
 325> uHisSerAspLeuAlaAspPheArgValArgTyrProAlaLeuValLeuLeuGlnTyrValAs
 2773 TGACCTCTTGCTGGCTGCGGCAACCAGGACTGAATGCCTGGAAGGGACTAAGGCACTCCTTGA
 346> pAspLeuLeuLeuAlaAlaAlaThrArgThrGluCysLeuGluGlyThrLysAlaLeuLeuGl
 2836 GACTTTGGGCAATAAGGGGTACCGAGCCTCTGGAAAGAAGGCCCAAATTTGCCTGCAAGAAGT
 367> uThrLeuGlyAsnLysGlyTyrArgAlaSerGlyLysLysAlaGlnIleCysLeuGlnGluVa
 2899 CACATACCTGGGGTACTCTTTAAAAGATGGCCAAAGGTGGCTTACCAAAGCTCGGAAAGAAGC
 388> lThrTyrLeuGlyTyrSerLeuLysAspGlyGlnArgTrpLeuThrLysAlaArgLysGluAl
 2962 CATCCTATCCATCCCTGTGCCTAAAAACCCACGACAAGTGAGAGAGTTCTTGGAACTGCAG
 499> sIleLeuSerIleProValProLysAsnProArgGlnValArgGluPheLeuGlyThrAla

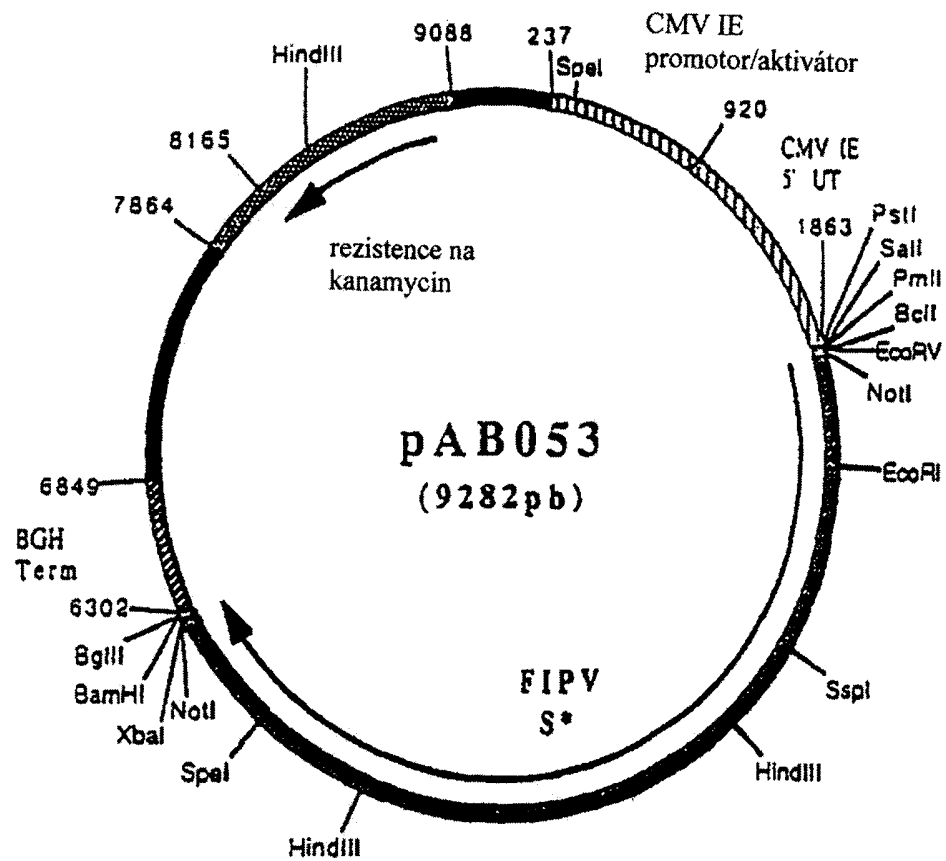
Obr. 5 - pokračování



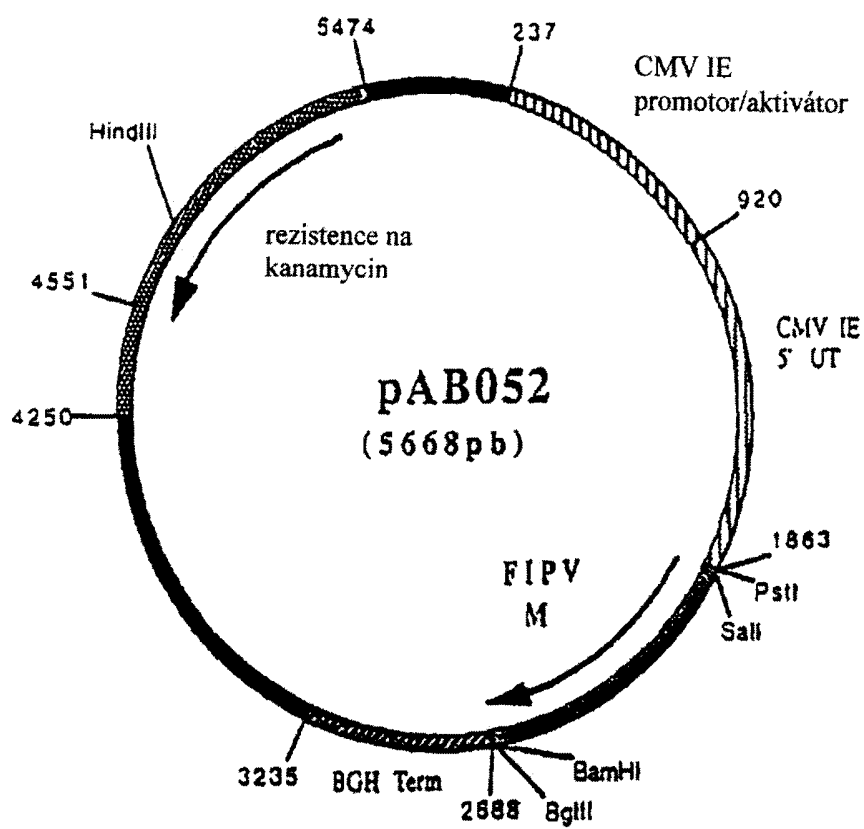
Obr. 6



Obr. 7

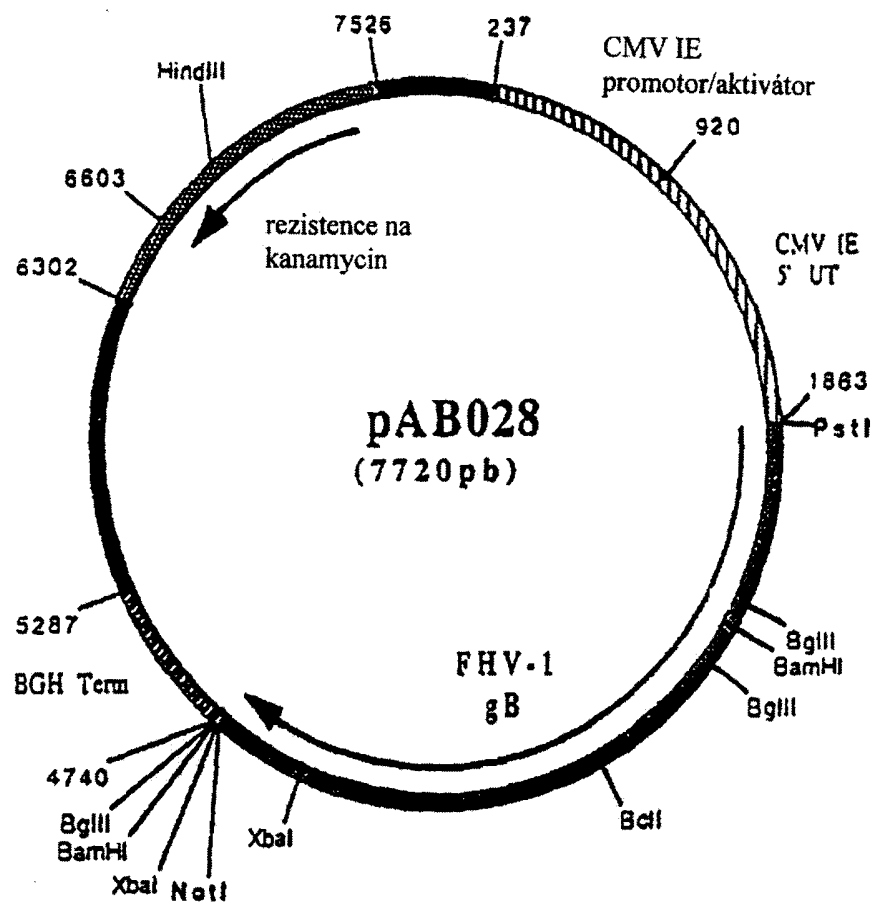


Obr. 8

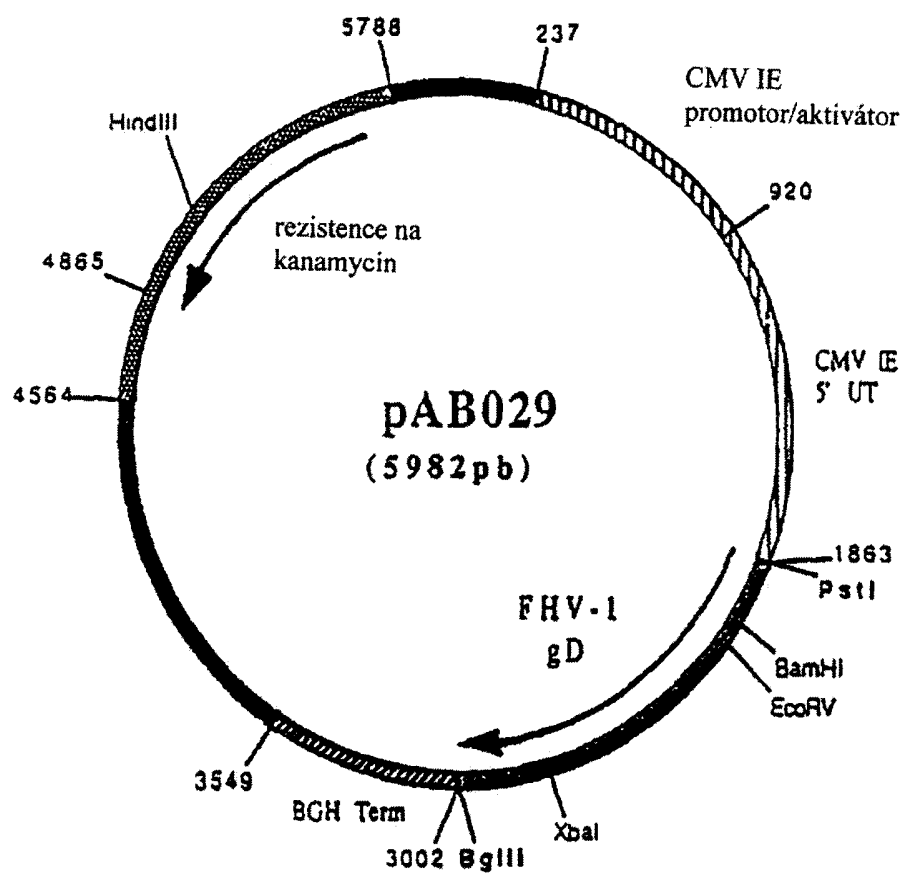


Obr. 9

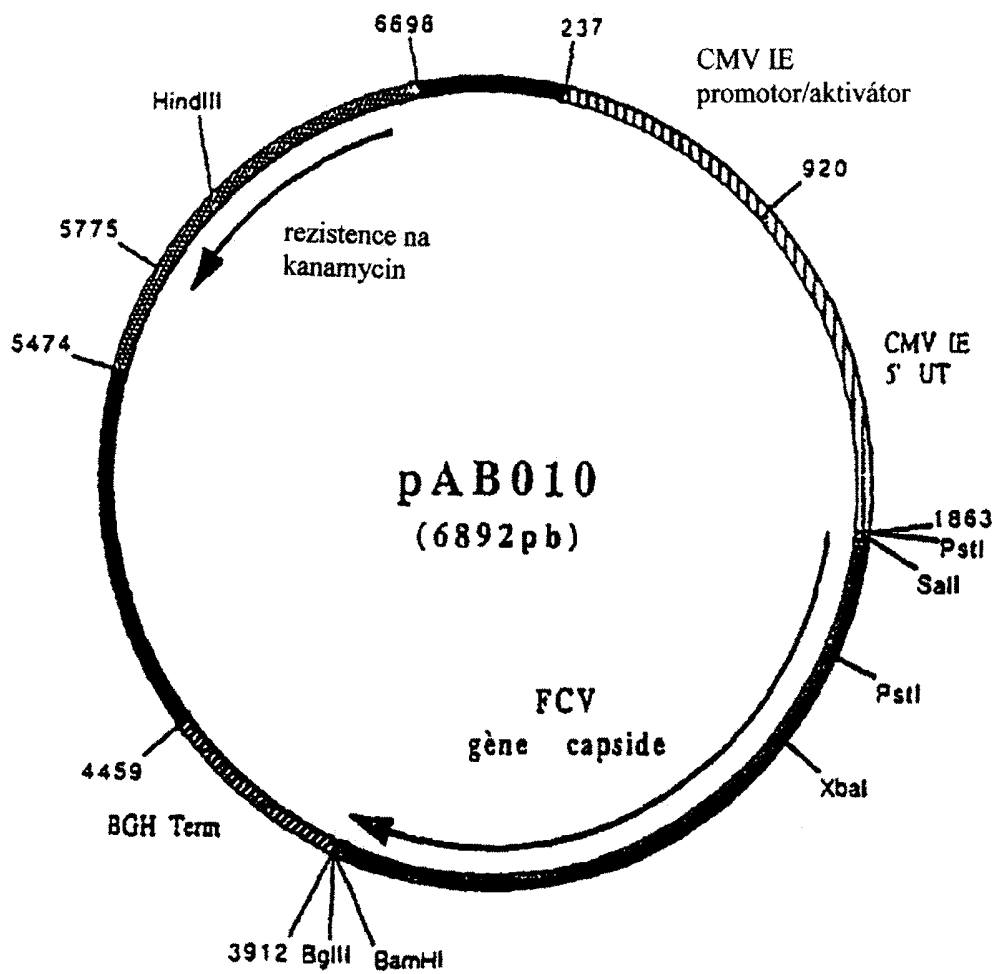
- 24 -



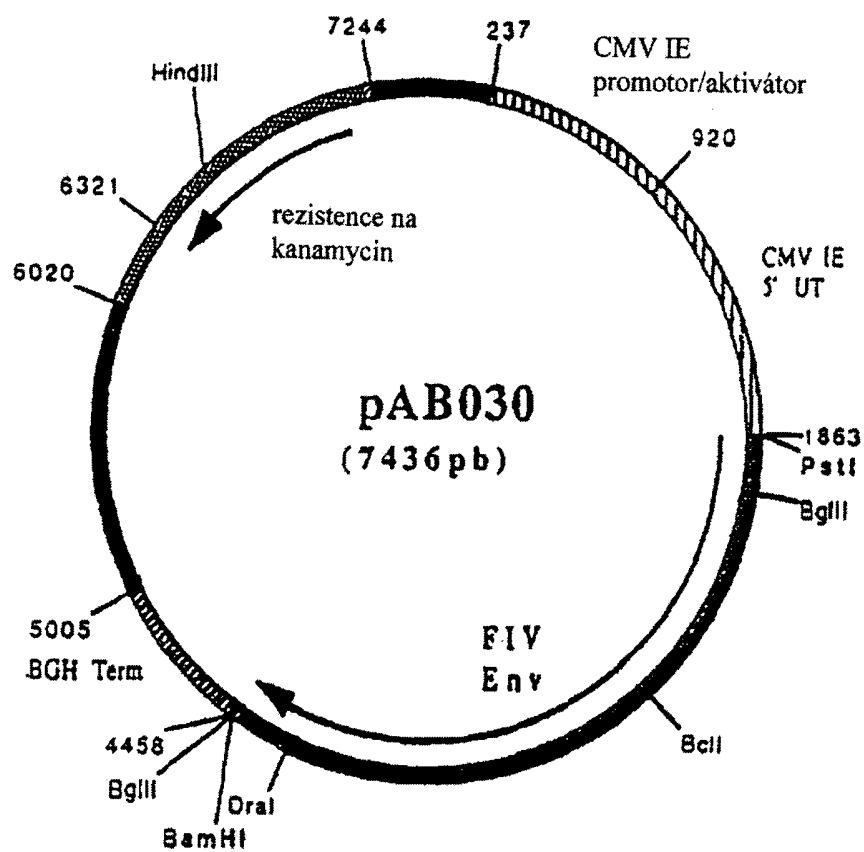
Obr. 11



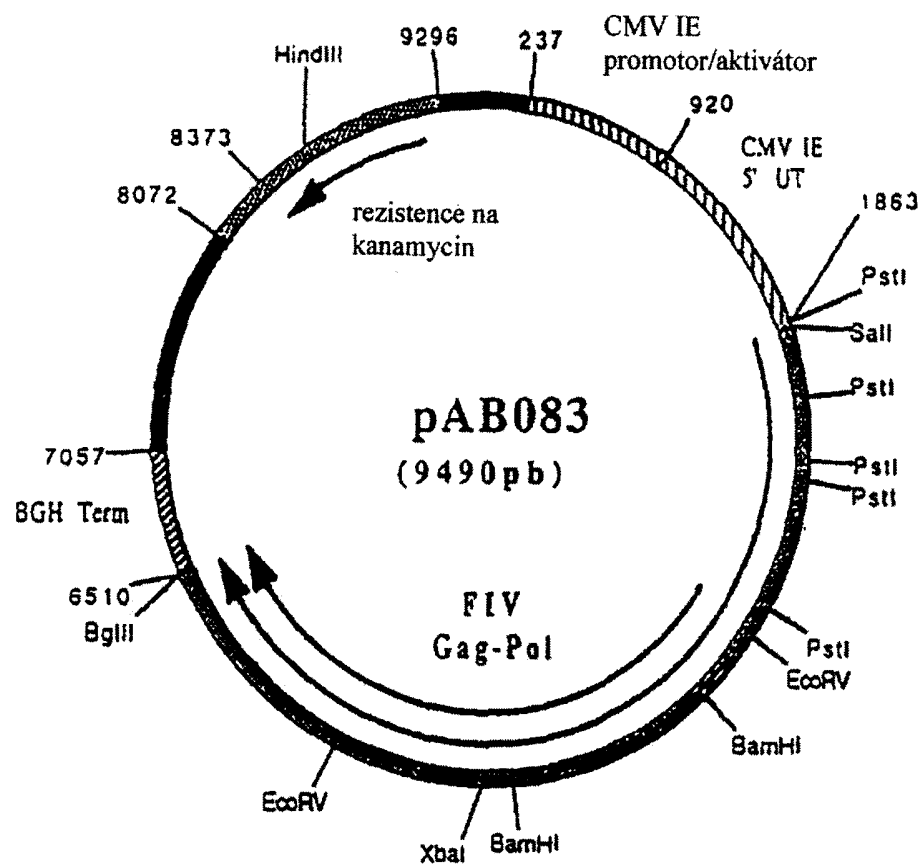
Obr. 12



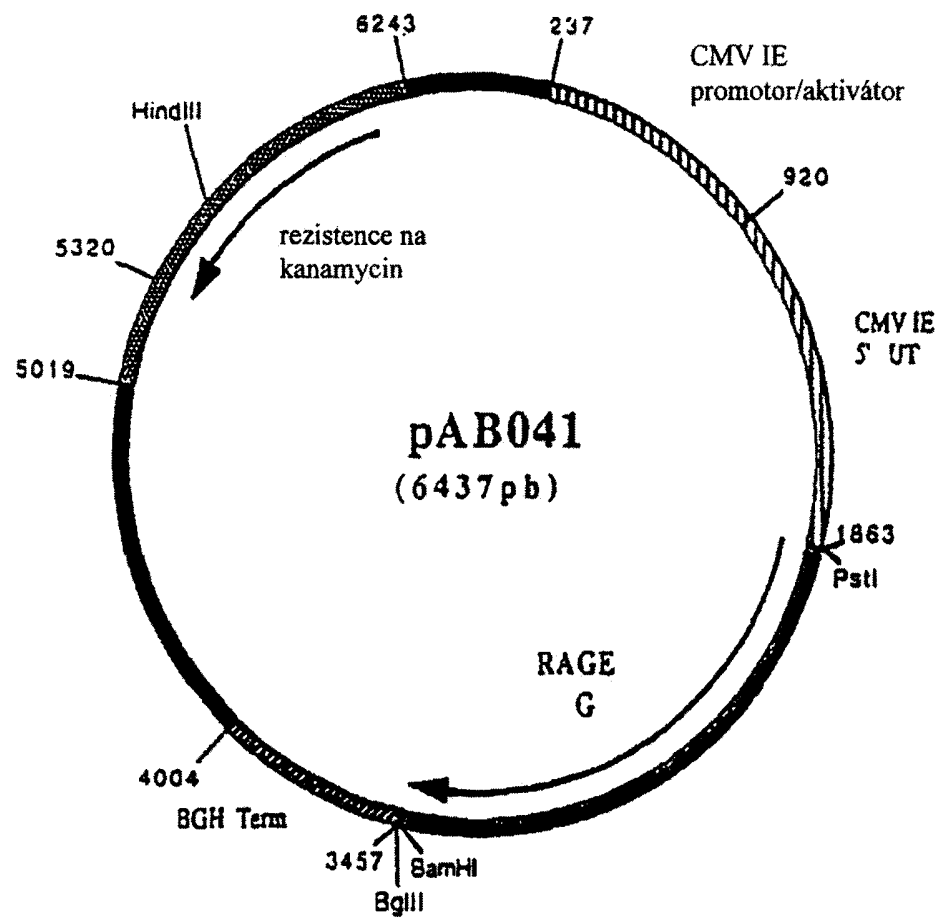
Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16

Konec dokumentu