

(11) Číslo dokumentu:

304 126

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C07K 14/165 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/50 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2007-505**

(22) Prihlášeno: **15.07.1997**

(30) Právo přednosti: **19.07.1996 FR 9609337**

(40) Zveřejněno: **16.06.1999**

(Věstník č. 6/1999)

(47) Uděleno: **25.09.2013**

(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **06.11.2013**

(Věstník č. 45/2013)

(86) PCT číslo: **PCT/FR1997/001315**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/003660**

(56) Relevantní dokumenty:

WO 93/15762; WO 95/20660; WO 96/06934.

Vennema H. et al.: "Primary structure of the membrane and nucleocapsid protein genes of feline infectious peritonitis virus and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses in kittens.", *Virology*, vol. 181(1), 327-335, 1991.

(73) Majitel patentu:

MERIAL, 69002 Lyon, FR

(72) Původce:

Audonnet Jean-Christophe, Lyon, FR

Bouchardon Annabelle, Lyon, FR

Baudu Philippe, Craponne, FR

Riviere Michel, Ecully, FR

(74) Zástupce:

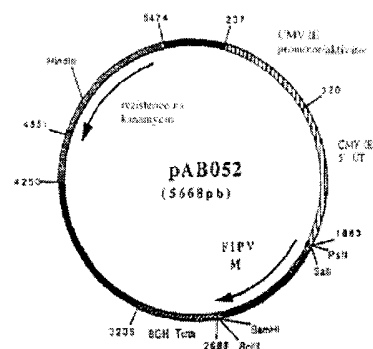
Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) **Název vynálezu:**

Imunogenní kompozice obsahující nukleovou kyselinu kódující M protein viru infekční peritonitidy koček a vakcína a kombinovaný vakcinační přípravek obsahující tuto imunogenní kompozici

(57) Anotace:

Řešení poskytuje imunogenní kompozici pro vyvolání imunitní odpovědi proti viru infekční peritonitidy u kočky, kterážto kompozice obsahuje plazmid, který obsahuje a exprimuje *in vivo* v buňce příjemce, kterým je kočka, molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující M protein viru infekční peritonitidy. Dále vynález poskytuje kombinovaný imunogenní přípravek pro vyvolání imunitní odpovědi u koček, který sestává z imunogenní kompozice, podle vynálezu a dalšího imunogenního přípravku, který je vybrán ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny.



CZ 304126 B6

Imunogenní kompozice obsahující nukleovou kyselinu kódující M protein viru infekční peritonitidy koček a vakcína a kombinovaný vakcinační přípravek obsahující tuto imunogenní kompozici

5

Oblast techniky

Vynález se týká imunogenní kompozice a vakcíny umožňující vakcinaci koček proti virové infekční peritonitidě. Dále se vynález týká kombinovaného vakcinačního přípravku, který obsahuje imunogenní kompozici podle vynálezu v kombinaci s vakcínou proti jinému kočičímu patogenu.

Dosavadní stav techniky

15

V minulosti byly již navrženy sdružené vakcíny proti různým virům koček. Sdružené vakcíny byly donedávna připravovány tak, že se vycházelo z neaktivních nebo ze živých vakcín a případně ze směsi takových vakcín. Jejich příprava představuje problémy se vzájemnou 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 s konzervací takových sdružených vakcín a také problém jejich neškodnosti, zejména v přítomnosti adjuvans. Tyto vakcíny jsou obecně dosti nákladné.

Příhlášky vynálezu WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 a WO-A-95 20660 využívají již dříve vyvinuté techniky polynukleotidových vakcín. Je známo, že v těchto vakcínách se 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 navázání DNA na povrch částice z 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).

Polynukleotidové vakcíny mohou také využívat holé DNA nebo DNA vázané na liposomy nebo kationtové lipidy.

Cílem předloženého vynálezu bylo vytvořit vícesložkové vakcíny umožňující vakcinaci proti určitému počtu virových chorob koček.

40

Dalším cílem vynálezu bylo vytvořit vakcínu sdružující různé složky, přičemž by zachovávala všechna požadovaná kritéria, kompatibility mezi jejími složkami a jejich stability.

Dalším cílem vynálezu bylo vytvořit vakcínu umožňující sdružit různé složky v témže nosiči.

45

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

Další cíl vynálezu se týkal způsobu vakcinace koček, který by umožnil významné zvýšení účinnosti vakcíny a přitom byl bezpečný.

50

Podstata vynálezu

Vynález řeší výše uvedené úkoly tím, že poskytuje imunogenní kompozici pro vyvolání imunitní odpovědi proti viru infekční peritonitidy koček (FIPV), kterážto kompozice obsahuje plazmid,

55

který obsahuje a exprimuje *in vivo* v buňce příjemce, kterým je kočka, molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující M protein viru infekční peritonitidy.

5 V jednom provedení plazmid dále obsahuje časný promotor cytomegaloviru (CMV–IE) operativně spojený s molekulou nukleové kyseliny.

10 Dále vynález poskytuje výše popsanou imunogenní kompozici, která dále obsahuje úplnou živou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo inaktivovanou úplnou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo rekombinantní vakcínu proti kočičímu patogenu nebo podjednotkovou vakcínu proti kočičímu patogenu.

Plazmid může obsahovat modifikovaný S nebo M antigen v případě infekční peritonitidy.

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

20 Výraz „gen“ patogenního činitele 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 pro kmen nebo skupinu kmenů. Zahrnuje také sekvence nukleotidů, které byly modifikovány pro usnadnění exprese *in vivo* hostitelským zvířetem, avšak kódující tentýž protein.

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

30 Imunogenní kompozice může obsahovat gen M nebo modifikovaný gen S viru FIPV v jednom plazmidu nebo soubor genů kódujících M a modifikovaný S v témže plazmidu nebo v různých plazmidech.

35 Vynález dále poskytuje použití jednoho nebo několika výše zmíněných plazmidů pro výrobu vakcíny určené k vakcinaci koček primárně vakcinovaných 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.

40 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 v primární vakcinaci a pro revakcinaci a formulací vakcíny.

45 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, kterážto první vakcína představuje antigen kódovaný polynukleotidovou vakcínou nebo antigen zajišťující zkříženou ochranu.

50 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 ochrana. Odborník rozpozná, že ostatní mají funkci doplňkovou a ilustrační.

Seznam obrázků na výkresech

- Obr. 1 Plazmid pVR1012
- 5 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
- 10 Obr. 7 Plazmid pAB009
- Obr. 8 Plazmid pAB053
- Obr. 9 Plazmid pAB052
- Obr. 10 Plazmid pAB056
- Obr. 11 Plazmid pAB02S
- 15 Obr. 12 Plazmid pAB029
- Obr. 13 Plazmid pAB010
- Obr. 14 Plazmid pAB030
- Obr. 15 Plazmid pAB083
- Obr. 16 Plazmid pAB041

20

Seznam sekvencí SEQ ID č.

- SED ID č. 1 Oligonukleotid PB247
- SED ID č. 2 Oligonukleotid PB249
- 25 SED ID č. 3 Oligonukleotid PB281
- SED ID č. 4 Oligonukleotid PB282
- SED ID č. 5 Sekvence genu env viru FeLV-B
- SED ID č. 6 Oligonukleotid PB283
- SED ID č. 7 Oligonukleotid PB284
- 30 SED ID č. 8 Sekvence genu gag/pol viru FeLV-A (Glasgow-1)
- SED ID č. 9 Oligonukleotid AB021
- SED ID č. 10 Oligonukleotid AB024
- SED ID č. 11 Oligonukleotid AB103
- SED ID č. 12 Oligonukleotid AB112
- 35 SED ID č. 13 Oligonukleotid AB113
- SED ID č. 14 Oligonukleotid AB104
- SED ID č. 15 Oligonukleotid AB101
- SED ID č. 16 Oligonukleotid AB102
- SED ID č. 17 Oligonukleotid AB106
- 40 SED ID č. 18 Oligonukleotid AB107
- SED ID č. 19 Oligonukleotid AB061
- SED ID č. 20 Oligonukleotid AB064
- SED ID č. 21 Oligonukleotid AB065

SED ID č. 22 Oligonukleotid AB066
 SED ID č. 23 Oligonukleotid AB025
 SED ID č. 24 Oligonukleotid AB026
 SED ID č. 25 Oligonukleotid AB067
 5 SED ID č. 26 Oligonukleotid AB070
 SED ID č. 27 Oligonukleotid AB154
 SED ID č. 28 Oligonukleotid AB155
 SED ID č. 29 Oligonukleotid AB011
 SED ID č. 30 Oligonukleotid AB012

10

Příklady provedení vynálezu

15 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 známy. 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

25 Příklad 2: Extrakce virové genomové DNA

Po kultivaci jsou supernatanty a lyzované buňky sklizeny a celková virová suspence 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 suspence se zpracuje proteinázou K (výsledná koncentrace 100 µg/ml) za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) (výsledná koncentrace 0,5 %) 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 1000 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 restrikčními enzymy.

30

35

Příklad 3: Izolace virové genomové RNA

40

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

45

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 restrikční fragmenty použité pro předložený vynález byly izolovány použitím soupravy „GeneClean“ (BIO 101 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 pBP179 (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).

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

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:

10

PB283 (33 mer) (SEQ ID č. 6)

5' TTGTCGACATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAG 3'

PB284 (40 mer) (SEQ ID č. 7)

5' TTGGATCCTTATTTAATTACTGCAGTTCCAAGGAAGTCTC 3'

15

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).

20

Příklad 10: Konstrukce plazmidu pAB009 (gen VP2 FPV)

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:

25

AB021 (34 mer) (SEQ ID č. 9)

5' TGCTCTAGAGCAATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC 3'

AB024 (33 mer) (SEQ ID č. 10)

5' CGCGGATCCATTAATATAATTTTCTAGGTGCTA 3'

30

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).

35

Příklad 11: Konstrukce plazmidu pAB053 (gen S FIPV)

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

40

AB103 (38 mer) (SEQ ID č. 11)

5'ATAAGAATGCGGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

AB112 (25 mer) (SEQ ID č. 12)

5'CGTACATGTGGAATTCCACTGGTTG 3'

pro 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
 5 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 FIPV (fragment B).

10 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru FIPV (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'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGGACATGCACTTTTTTC 3'

15 pro amplifikaci sekvence části 3' genu kódujícího glykoprotein S viru FIPV 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 (obr. 8).

20

Příklad 12: Konstrukce plazmidu pAB052 (gen FIPV M)

25 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru infekční peritonitidy koček (FIPV) (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'

30 pro přesnou izolaci genu kódujícího glykoprotein N viru FIPV 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).

35

Příklad 13: Konstrukce plazmidu pAB056 (gen FIPV N)

5 Reakce RT–PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru infekční peritonitidy koček (FIPV) (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 C. 18)

5' CGCGGATCCTTAGTTCGTAACCTCATCAATCATCTC 3'

10 pro přesnou izolaci genu kódujícího protein N viru FIPV 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 byl potom ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB056 (6011 bp) (obr. 10).

15 Příklad 14: Konstrukce plazmidu pAB028 (gen FHV gB)

20 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'

25 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 plazmidu pAB028 (7720 bp) (obr. 11).

30 Příklad 15: Konstrukce plazmidu pAB029 (gen FHV gD)

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:

35

AB065 (36 mer) (SEQ ID č. 21)

5' AAAACTGCAGCCAAGATGACACGTCTACATTTTTT 3'

AB066 (33 mer) (SEQ ID č. 22)

5' GGAAGATCTTTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT 3'

pro amplifikaci genu kódujícího glykoprotein gD viru FGV–1 ve formě fragmentu PstI–BglII. Po vyčištění byl produkt PCR 1147 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).

5 Příklad 16: Konstrukce plazmidu pAB010 (gen FCV C)

Reakce RT-PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA kalciviru koček (FCV) (kmen F9) (M. Carter a kol. Virology. 1192, 190, 443–448), připravenou technikou podle příkladu 3 a s těmito oligonukleotidy:

10

AB025 (33 mer) SEQ ID č. 23)

5'ACGCGTCGACGCATGTGCTCAACCTGCGCTAAC 3'

AB026 (31 mer) (SEQ ID č. 24)

5'CGCGGATCCTCATAACTTAGTCATGGGACTC 3'

15

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 potom ligován do vektoru pVR1012 (příklad 6), předtím rozštěpeného Sall a BamHI, čímž byl získán plazmid pAB010 (6892 bp) (obr. 13).

20

Příklad 17: Konstrukce plazmidu pAB030 (gen env FIV)

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

25

AB067 (36 mer) (SEQ ID č. 25)

5'AAAACTGCAGAAGGAATGGCAGAAGGATTTGCAGCC 3'

AB070 (36 mer) (SEQ ID č. 26)

5'CGCGGATCCTCATTCCTCCCTTTTTCAGACATGCC 3'

30

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).

35

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

Reakce RT-PCR byla provedena technikou podle příkladu 5 a s genomovou RNA viru imunodeficiency 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:

40

AB154 (32 mer) (SEQ ID č. 27)

5'ACGCGTCGACATGGGGAATGGACAGGGGCGAG 3'

AB155 (33 mer) (SEQ ID č. 28)

5'TGAAGATCTTCACTCATCCCCCTTCAGGAAGAGC 3'

5 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).

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

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:

15

AB011 (33 mer) (SEQ ID č. 29)

5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID č. 30)

5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

20 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).

25 Příklad 20: Příprava a čištění plazmidů

25

Pro přípravu plazmidů určených pro vakcinaci zvířat je možno použít všechny techniky umožňující získat suspensi 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 účel se plazmidy resuspendují buď v ultračisté vodě nebo v pufru TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

40 Příklad 21: Průmyslová výroba sdružených vakcín

40

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.

5 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 straně stehna.

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

20 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Imunogenní kompozice pro vyvolání imunitní odpovědi proti viru infekční peritonitidy u příjemce, kterým je kočka, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje plazmid, který obsahuje a exprimuje in vivo v buňce příjemce, kterým je kočka, molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující M protein viru infekční peritonitidy.

2. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že plazmid dále obsahuje časný promotor cytomegaloviru (CMV-IE) operativně spojený s molekulou nukleové kyseliny.

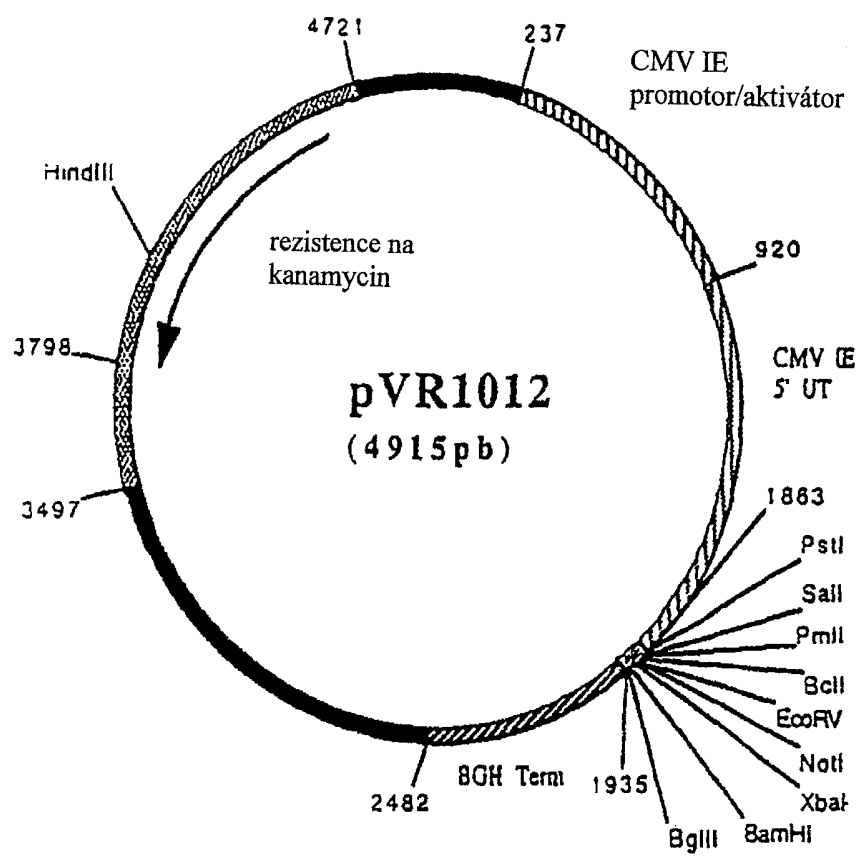
3. Imunogenní kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje úplnou živou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo inaktivovanou úplnou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo rekombinantní vakcínu proti kočičímu patogenu nebo podjednotkovou vakcínu proti kočičímu patogenu.

4. Použití imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu imunogenního přípravku pro vyvolání imunitní odpovědi u koček.

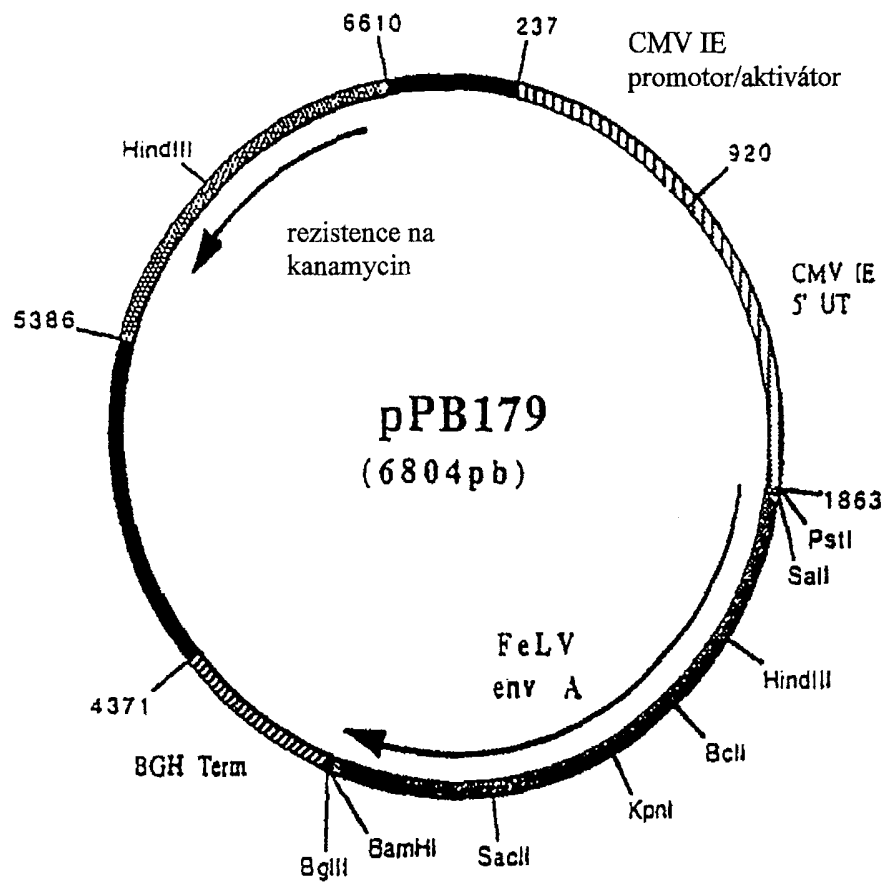
5. Použití imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu kombinovaného imunogenního přípravku pro vyvolání imunitní odpovědi u koček, kde kombinovaný imunogenní přípravek sestává z imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 a imunogenního přípravku, který je vybrán ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, přičemž imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 se podává po předchozím podání imunogenního přípravku.

6. Použití imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu kombinovaného imunogenního přípravku pro vyvolání imunitní odpovědi u koček, kde kombinovaný imunogenní přípravek sestává z imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 a imunogenního přípravku, který je vybrán ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, přičemž imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 se podává 2 až 6 týdnů po podání imunogenního přípravku.

7. Použití imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu kombinovaného imunogenního přípravku pro vyvolání imunitní odpovědi u koček, kde kombinovaný imunogenní přípravek sestává z imunogenní kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 a živé úplné vakcíny proti kočičímu patogenu, inaktivované úplné vakcíny proti kočičímu patogenu, rekombinantní vakcíny proti kočičímu patogenu a podjednotkové vakcíny proti kočičímu patogenu.
8. Veterinární souprava, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje (I) imunogenní kompozici podle nároku 1 a (II) kočičí vakcínu vybranou ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny.
9. Plazmid obsahující a exprimující in vivo v buňkách příjemce, kterým je kočka, molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující M protein viru infekční peritonitidy.
10. Vakcína pro vyvolání imunitní odpovědi proti viru infekční peritonitidy u příjemce, kterým je kočka, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje plazmid obsahující a exprimující in vivo v buňkách příjemce, kterým je kočka, molekulu nukleové kyseliny mající sekvenci kódující M protein viru infekční peritonitidy.
11. Vakcína podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že plazmid dále obsahuje časný promotor cytomegaloviru (CMV–IE) operativně spojený s molekulou nukleové kyseliny.
12. Vakcína podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje úplnou živou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo inaktivovanou úplnou vakcínu proti kočičímu patogenu, nebo rekombinantní vakcínu proti kočičímu patogenu nebo podjednotkovou vakcínu proti kočičímu patogenu.
13. Použití vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12 pro výrobu kočičí vakcíny pro očkování koček.
14. Použití vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12 pro výrobu kombinovaného vakcinačního přípravku pro očkování koček, kde kombinovaný vakcinační přípravek sestává z první vakcíny vybrané ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, a druhé vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12, která se podává po předchozím podání první vakcíny.
15. Použití vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12 pro výrobu kombinovaného vakcinačního přípravku pro očkování koček, kde kombinovaný vakcinační přípravek sestává z první vakcíny vybrané ze skupiny sestávající z živé úplné vakcíny, inaktivované úplné vakcíny, podjednotkové vakcíny a rekombinantní vakcíny, a druhé vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12, která se podává 2 až 6 týdnů po podání první vakcíny.
16. Použití vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12 pro výrobu kombinovaného vakcinačního přípravku pro očkování koček, kde kombinovaný vakcinační přípravek je tvořen kombinací vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 10, 11 nebo 12 a živé úplné vakcíny proti kočičímu patogenu, nebo inaktivované úplné vakcíny proti kočičímu patogenu, nebo rekombinantní vakcíny proti kočičímu patogenu nebo podjednotkové vakcíny proti kočičímu patogenu.



Obr. 1



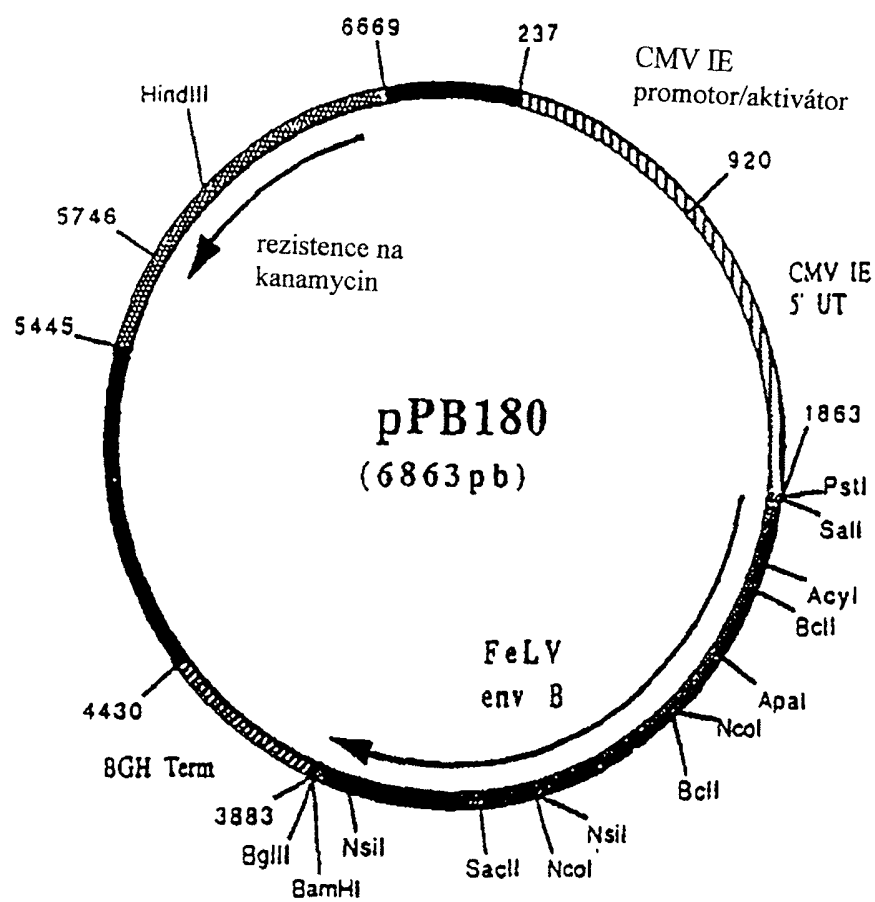
Obr. 2

1 ATGGAAGGTCCAACGCACCCAAAACCTCTAAAGATAAGACTTTCTCGTGGGACCTAATGATT
 121 MetGlyGlyProThrHisProLysProSerLysAspLysThrPheSerTrpAspLeuMetIle
 64 CTGGTGGGGCTCTTACTAAGACTGGACGTGGGAATGGCCAATCCTAGTCCGCACCAAATATAT
 221 LeuValGlyValLeuLeuArgLeuAspValGlyMetAlaAsnProSerProHisGlnIleTyr
 127 AATGTAACCTTGGACAATAACCAACCTTGTAACCTGGAACAAAGGCTAATGCCACCTCCATGTTG
 431 AsnValThrTrpThrIleThrAsnLeuValThrGlyThrLysAlaAsnAlaThrSerMetLeu
 190 GGAACCCCTGACAGACGCCCTTCCCTACCATGTATTTTGACTTATGTGATATAATAGGAAATACA
 641 GlyThrLeuThrAspAlaPheProThrMetTyrPheAspLeuCysAspIleIleGlyAsnThr
 253 TGAACCCCTCAGATCAAGAACCATTCCCAGGGTATGGATGTGATCAGCCTATGAGGAGGCTGG
 851 TrpAsnProSerAspGlnGluProPheProGlyTyrGlyCysAspGlnProMetArgArgTrp
 316 CGACAGAGAAAACACACCCCTTTTATGCTCTGTCCAGGACATGCCAACCAGGAAGCAATGTGGGGGG
 1061 ArgGlnArgAsnThrProPheTyrValCysProGlyHisAlaAsnArgLysGlnCysGlyGly
 379 CCACAGGATGGGTCTCTGCGCTGTATGGGGTTCGAGACACCAGGGGAAACCTATTGGAGACCC
 1271 ProGlnAspGlyPheCysAlaValTrpGlyCysGluThrThrGlyGluThrTyrTrpArgPro
 442 ACCTCCTCATGGGACTACATCACAGTAAAAAAGGGGTACTCAGGGAATATATCAATGTACT
 1481 ThrSerSerTrpAspTyrIleThrValLysLysGlyValThrGlnGlyIleTyrGlnCysSer
 505 GGAGGTGGTGGTGTGGGGCCCTGTTACGATAAAGCTGTTCACTCCTCGACAACGGGAGCTAGT
 1691 GlyGlyGlyTrpCysGlyProCysTyrAspLysAlaValHisSerSerThrThrGlyAlaSer
 568 GAAGGGGGCCGGTGCAACCCCTTGATCTTGCAATTTACCCAAAAGGGAAGACAAACATCTTGG
 1901 GluGlyGlyArgCysAsnProLeuIleLeuGlnPheThrGlnLysGlyArgGlnThrSerTrp
 631 GATGGACCTAAGTCATGGGGGCTACGACTATACCGTTCAGGATATGACCCTATAGCCCTGTTC
 2111 AspGlyProLysSerTrpGlyLeuArgLeuTyrArgSerGlyTyrAspProIleAlaLeuPhe
 694 TCGGTATCCCGGCAAGTAATGACCATTACGCCGCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTG
 2321 SerValSerArgGlnValMetThrIleThrProProGlnAlaMetGlyProAsnLeuValLeu
 757 CCTGATCAAAAACCCCATCCAGGCAATCTCAAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCATTCC
 2531 ProAspGlnLysProProSerArgGlnSerGlnIleGluSerArgValThrProHisHisSer
 820 CAAGGCAACGGAGGCACCCAGGTGTAACCTCTTGTTAATGCCTCCATTGCCCCCTCTACGTACC
 2741 GlnGlyAsnGlyGlyThrProGlyValThrLeuValAsnAlaSerIleAlaProLeuArgThr
 883 CCTGTCAACCCCGCAAGTCCCAAACGTATAGGGACCGGAAATAGGTTAATAAATTTAGTCCAA
 2951 ProValThrProAlaSerProLysArgIleGlyThrGlyAsnArgLeuIleAsnLeuValGln
 946 GGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAACTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTG
 3161 GlyThrTyrLeuAlaLeuAsnAlaThrAspProAsnLysThrLysAspCysTrpLeuCysLeu
 1009 GTTTCCTCGACCACCTTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACAGCAACCAACAAAC
 3371 ValSerArgProProTyrTyrGluGlyIleAlaIleLeuGlyAsnTyrSerAsnGlnThrAsn
 1072 CCCTCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGCAACATAAGCTAACTATATCTGAGGTGTCAGGGCAA
 3581 ProSerProSerCysLeuSerThrProGlnHisLysLeuThrIleSerGluValSerGlyGln
 1135 GGACTGTGCATAGGGACTGTTCCTAAGACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGA
 3791 GlyLeuCysIleGlyThrValProLysThrHisGlnAlaLeuCysAsnLysThrGlnGlnGly
 1198 CATACAGGGGCTCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACTC
 4001 HisThrGlyAlaHisTyrLeuAlaAlaProAsnGlyThrTyrTrpAlaCysAsnThrGlyLeu

Obr. 3

1261 ACCCCATGCATTTCCATGGCAGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTGTGTCTTAATCGAATTA
 421 ▶ ThrProCysIleSerMetAlaValLeuAsnTrpThrSerAspPheCysValLeuIleGluLeu
 1324 TGGCCCAGAGTGACCTACCATCAACCCGAATACATTTACACACATTTCCACAAAGCTGTGAGG
 442 ▶ TrpProArgValThrTyrHisGlnProGluTyrIleTyrThrHisPheAspLysAlaValArg
 1387 TTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACC GTTGCCTTATAATGGGAGGACTCACTGTAGGGGGC
 463 ▶ PheArgArgGluProIleSerLeuThrValAlaLeuIleMetGlyGlyLeuThrValGlyGly
 1450 ATAGCCGCGGGGCTCGGAACAGGGACTAAAGCCCTCCTTGAAACAGCCAGTTCAGACAAC TA
 484 ▶ IleAlaAlaGlyValGlyThrGlyThrLysAlaLeuLeuGluThrAlaGlnPheArgGlnLeu
 1513 CAAATGGCTATGCACGCAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAATTAGTGCCTTAGAAAAATCC
 505 ▶ GlnMetAlaMetHisAlaAspIleGlnAlaLeuGluGluSerIleSerAlaLeuGluLysSer
 1576 CTGACCTCCCTCTCCGAGGTAGTCTTACAAAATAGACGGGGCCTAGATATTCTGTTCTTACAA
 526 ▶ LeuThrSerLeuSerGluValValLeuGlnAsnArgArgGlyLeuAspIleLeuPheLeuGln
 1639 AAGGGAGGGCTCTGTGCCGCCCTTAAAGGAAGAATGCTGCTTCTATGCAGATCACACCGGACTC
 547 ▶ LysGlyGlyLeucysAlaAlaLeuLysGluGluCysCysPheTyrAlaAspHisThrGlyLeu
 1702 GTCAGAGACAATATGGCTAAATTAAGAGAAAGACTGAAACAGCGACAACAACTGTTTGACTCC
 568 ▶ ValArgAspAsnMetAlaLysLeuArgGluArgLeuLysGlnArgGlnGlnLeuPheAspSer
 1765 CAACAGGGATGGTTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCCCCCTGGTTTACAACCCTAATTTCTCTCC
 589 ▶ GlnGlnGlyTrpPheGluGlyTrpPheAsnLysSerProTrpPheThrThrLeuIleSerSer
 1828 ATTATAGGCCCTTACTAATCCTACTCCTAATTCCTCTTCCGGCCCATGCATCCTTAACCGA
 610 ▶ IleIleGlyProLeuLeuIleLeuLeuLeuIleLeuLeuPheGlyProCysIleLeuAsnArg
 1891 TTAGTGCAATTCGTAAAAGACAGAATATCTGTGGTACAAGCCTTAATTTTAACCCAACAGTAC
 631 ▶ LeuValGlnPheValLysAspArgIleSerValValGlnAlaLeuIleLeuThrGlnGlnTyr
 1954 CAACAGATACAGCAATATGATCCGGACCGACCATGA
 652 ▶ GlnGlnIleGlnGlnTyrAspProAspArgPro...

Obr. 3 - pokračování



Obr. 4

1 ATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAGCCATTGGGGCTCATCTGTTTGGGGTCTCACCTGAATAC
 1> MetSerGlyAlaSerSerGlyThrAlaIleGlyAlaHisLeuPheGlyValSerProGluTyr
 64 AAGGTGTTGATCGGAGACGAGGGAGCCGACCCTCAAGGTCTCTTCTGAGGTTTCATTTTCCG
 22> ArgValLeuIleGlyAspGluGlyAlaGlyProSerArgSerLeuSerGluValSerPheSer
 127 GTTTGGTACCAAAGACGCGCGGCACGTCTTGTCATTTTTTGTCTGGTTGCGTCTTTTCTTGTC
 43> ValTrpTyrGlnArgArgAlaAlaArgLeuValIlePheCysLeuValAlaSerPheLeuVal
 190 CCTTGTCTAACCTTTTTTAATTGCAGAAACCGTCATGGGCCAAACTATAACTACCCCTTAAGC
 64> ProCysLeuThrPheLeuIleAlaGluThrValMetGlyGlnThrIleThrThrProLeuSer
 253 CTCACCCTTGATCACTGGTCTGAAGTCCGGGCACGAGCCCATATCAAGGTGTGAGGTCCGG
 85> LeuThrLeuAspHisTrpSerGluValArgAlaArgAlaHisAsnGlnGlyValGluValArg
 316 AAAAAGAAATGGATTACCTTATGTGAGGCCGAATGGGTGATGATGAATGTGGGCTGGCCCCGA
 105> LysLysLysTrpIleThrLeuCysGluAlaGluTrpValMetMetAsnValGlyTrpProArg
 379 GAAGGAACCTTTTTTCTCTTGATAGCATTTCCAGGTTGAAAAGAAGATCTTCGCCCCGGACCA
 127> GluGlyThrPheSerLeuAspSerIleSerGlnValGluLysLysIlePheAlaProGlyPro
 442 TATGGACACCCCGACCAAGTTCCTTACATTACTACATGGAGATCCTTAGCCACAGACCCCTT
 148> TyrGlyHisProAspGlnValProTyrIleThrThrTrpArgSerLeuAlaThrAspProPro
 555 TCGTGGGTTCGTCCGTTCCTACCCCTCCCAAACCTCCACACCCCTCCCTCAACCTCTTTCCG
 169> SerTrpValArgProPheLeuProProProLysProProThrProLeuProGlnProLeuSer
 568 CCGCAGCCCTCCGCCCCCTCTTACCTCTTCCCTCTACCCGTTCTCCCAAGCCAGACCCCCC
 190> ProGlnProSerAlaProLeuThrSerSerLeuTyrProValLeuProLysProAspProPro
 631 AAACCGCCTGTGTTACCGCCTGATCCTTCTTCCCTTTAATTGATCTCTTAACAGAAGAGCCA
 211> LysProProValLeuProProAspProSerSerProLeuIleAspLeuLeuThrGluGluPro
 694 CCTCCCTATCCGGGGGGTACGGGGCCACCGCCATCAGGTCTTAGGACCCCAACCGCTTCCCCG
 232> ProProTyrProGlyGlyHisGlyProProProSerGlyProArgThrProThrAlaSerPro
 757 ATTGCAAGCCGGCTAAGGGAACGACGAGAAAACCTGCTGAAGAATCGCAAGCCCTCCCTTG
 253> IleAlaSerArgLeuArgGluArgGluArgGluAsnProAlaGluGluSerGlnAlaLeuProLeu
 820 AGGGAAGGCCCAACAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCTTCAGACTTGTATAACTGG
 274> ArgGluGlyProAsnAsnArgProGlnTyrTrpProPheSerAlaSerAspLeuTyrAsnTrp
 883 AAGTCGCATAACCCCCCTTTCTCCCAAGATCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATT
 295> LysSerHisAsnProProPheSerGlnAspProValAlaLeuThrAsnLeuIleGluSerIle
 946 TTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGACGACTGCCAGCAGCTCTTGCAGGCACTCCTGACAGGC
 316> LeuValThrHisGlnProThrTrpAspAspCysGlnGlnLeuLeuGlnAlaLeuLeuThrGly
 1009 GAAGAAAGGCAAAGGGTCCTTCTTGAGGCCCGAAAGCAGGTTCCAGGCGAGGACGGACGGCCA
 337> GluGluArgGlnArgValLeuLeuGluAlaArgLysGlnValProGlyGluAspGlyArgPro
 1072 ACCCAACTACCCAATGTTCATTGACGAGACTTTCCCTTGACCCGTCCCAACTGGGATTTTGCT
 358> ThrGlnLeuProAsnValIleAspGluThrPheProLeuThrArgProAsnTrpAspPheAla
 1135 ACGCCGGCAGGTAGGGAGCACCTACGCCTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGG
 379> ThrProAlaGlyArgGluHisLeuArgLeuTyrArgGlnLeuLeuLeuAlaGlyLeuArgGly

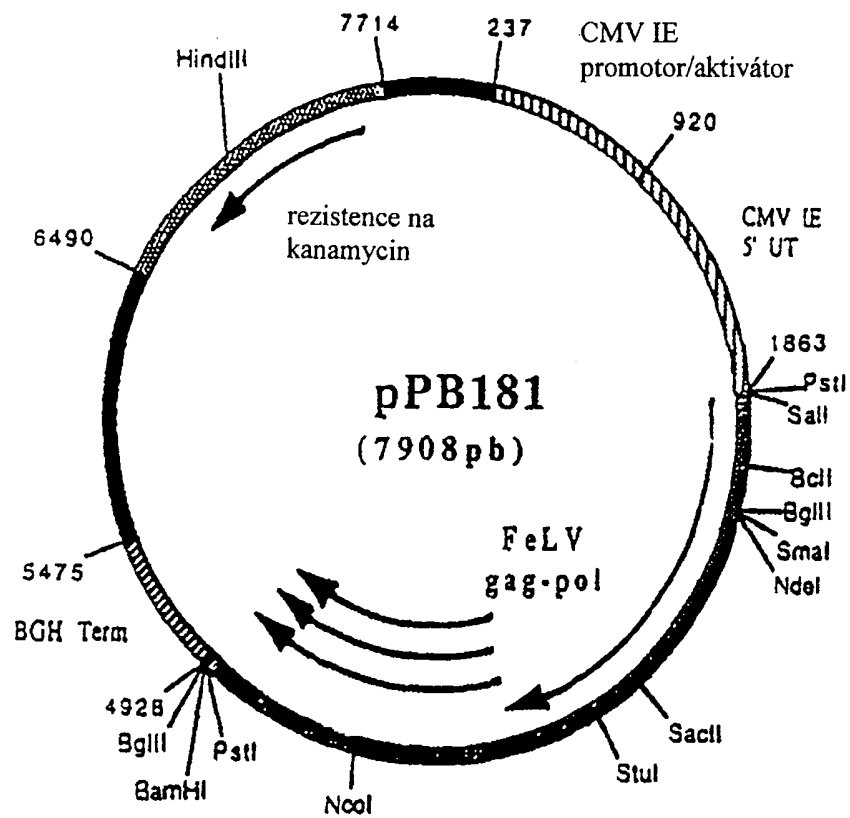
Obr. 5

1198 GCTGCAAGACGCCCCACTAATTTGGCACAGGTAAAGCAGGTTGTACAAGCGAAAGAGGAAACG
 409 ▶ AlaAlaArgArgProThrAsnLeuAlaGlnValLysGlnValValGlnGlyLysGluGluThr
 1251 CCAGCAGCATTTTTAGAAAGATTAAAGAGGGCTTATAGAATGTACACTCCCTATGACCCTGAG
 421 ▶ ProAlaAlaPheLeuGluArgLeuLysGluAlaTyrArgMetTyrThrProTyrAspProGlu
 1324 GACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTTATATACCAGTCTAGCCCAGATATAAGA
 442 ▶ AspProGlyGlnAlaAlaSerValIleLeuSerPheIleTyrGlnSerSerProAspIleArg
 1387 AATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCTACAAGGGTTCACCCTATCTGATCTGCTAAAAGAGGCA
 463 ▶ AsnLysLeuGlnArgLeuGluGlyLeuGlnGlyPheThrLeuSerAspLeuLeuLysGluAla
 1450 GAAAAGATATACAACAAAAGGGAGACCCAGAGGAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGACAG
 484 ▶ GluLysIleTyrAsnLysArgGluThrProGluGluArgGluGluArgLeuTrpGlnArgGln
 1513 GAAGAAAGAGATAAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAG
 505 ▶ GluGluArgAspLysLysArgHisLysGluMetThrLysValLeuAlaThrValValAlaGln
 1576 AATAGAGATAAGGATAGAGAAGAAAGTAAACTGGGGGATCAAAGGAAAATACCTCTGGGGAAA
 526 ▶ AsnArgAspLysAspArgGluGluSerLysLeuGlyAspGlnArgLysIleProLeuGlyLys
 1639 GACCAGTGTGCCTATTGCAAGGAAAAGGGGCATTGGGTTTCGCGATTGCCCAACGACCCAGG
 547 ▶ AspGlnCysAlaTyrCysLysGluLysGlyHisTrpValArgAspCysProLysArgProArg
 1702 AAGAAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCAACTTAGGAGATTAGGAGAGTCAGGGCCAGGACCCC
 568 ▶ LysLysProAlaAsnSerThrLeuLeuAsnLeuGlyAsp...
 1 ▶ GluIleArgArgValArgAlaArgThrPro
 1765 CCCCCCTGAGCCCAGGATAACCTTAAAAATAGGGGGGCAACCGGTGACTTTTCTGGTGGAC
 10 ▶ oProProGluProArgIleThrLeuLysIleGlyGlyGlnProValThrPheLeuValAspTh
 1828 GGGAGCCCAGCACTCAGTACTGACTCGACCAGATGGACCTCTCAGTGACCGCACAGCCCTGGT
 31 ▶ rGlyAlaGlnHisSerValLeuThrArgProAspGlyProLeuSerAspArgThrAlaLeuVa
 1891 GCAAGGAGCCACGGGAAGCAAAAACCTACCGGTGGACCACCGACAGGAGGGTACAACCTGGCAAC
 52 ▶ lGlnGlyAlaThrGlySerLysAsnTyrArgTrpThrThrAspArgArgValGlnLeuAlaTh
 1954 CGGTAAGGTGACTCATTTCTTTTATATGTACCTGAATGTCCCTACCCGTTATTAGGGAGAGA
 73 ▶ rGlyLysValThrHisSerPheLeuTyrValProGluCysProTyrProLeuLeuGlyArgAs
 2017 CCTATTAACATAACTTAAGGCCAAATCCATTTTACCCGAGAAGGGGCTAATGTTGTTGGGCC
 94 ▶ pLeuLeuThrLysLeuLysAlaGlnIleHisPheThrGlyGluGlyAlaAsnValValGlyPro
 2080 CAGGGGTTTACCCCTACAAGTCCTTACTTTACAATTAGAAGAGGAGTATCGGCTATTTGAGCC
 115 ▶ oArgGlyLeuProLeuGlnValLeuThrLeuGlnLeuGluGluGluTyrArgLeuPheGluPro
 2143 AGAAAGTACACAAAACAGGAGATGGACACTTGGCTTAAAAACTTTCCCCAGGCGTGGGCAGA
 136 ▶ oGluSerThrGlnLysGlnGluMetAspThrTrpLeuLysAsnPheProGlnAlaTrpAlaGl

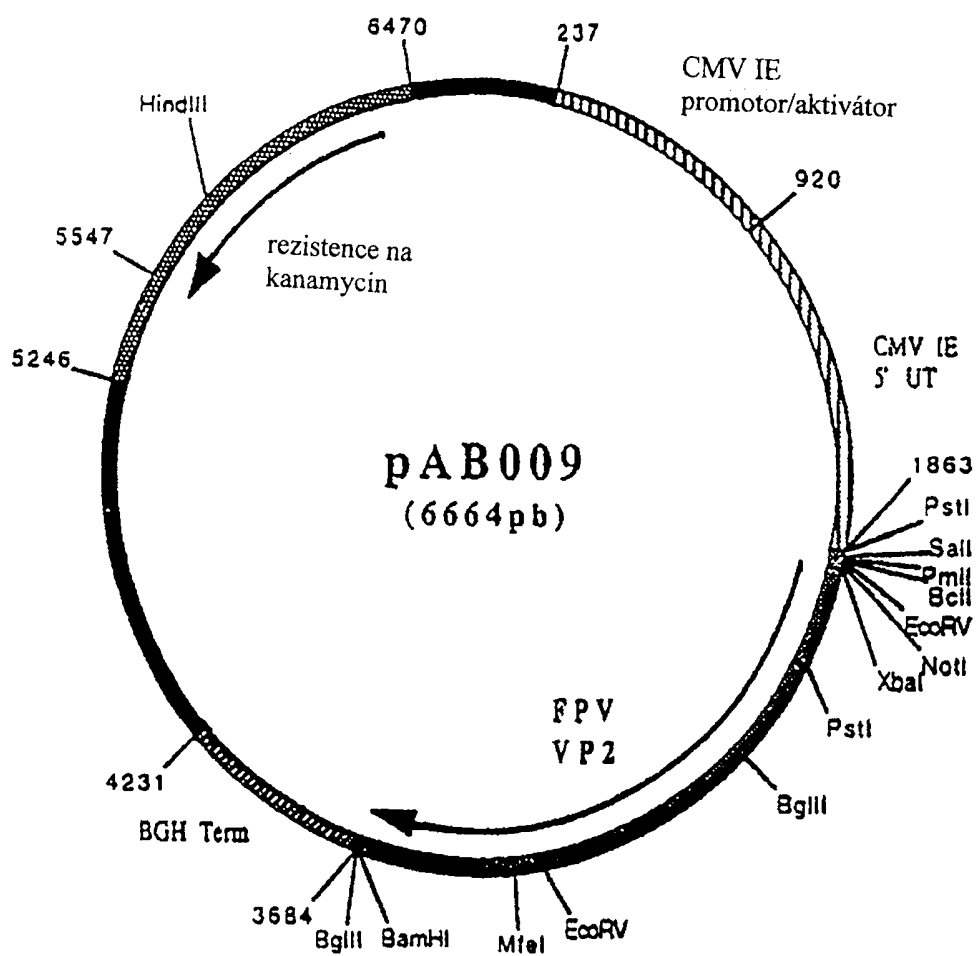
Obr. 5 - pokračování

2256 AACAGGAGGTATGGGAATGGCTCATTGTCAAGCCCCCTTCTCATTCAACTTAAGGCTACTGC
 157▶ uThrGlyGlyMetGlyMetAlaHisCysGlnAlaProValLeuIleGlnLeuLysAlaThrAl
 2269 CACTCCAATCTCCATCCGACAGTATCCTATGCCCCATGAAGCGTACCAGGGAATTAAGCCTCA
 178▶ aThrProIleSerIleArgGlnTyrProMetProHisGluAlaTyrGlnGlyIleLysProHi
 2332 TATAAGAAGAATGCTAGATCAAGGCATCCTCAAGCCCTGCCAGTCCCCATGGAATACACCCTT
 199▶ sIleArgArgMetLeuAspGlnGlyIleLeuLysProCysGlnSerProTrpAsnThrProLe
 2395 ATTACCTGTTAAGAAGCCAGGGACCGAGGATTACAGACCAGTGCAGGACTTAAGAGAAGTAAA
 220▶ uLeuProValLysLysProGlyThrGluAspTyrArgProValGlnAspLeuArgGluValAs
 2458 CAAAAGAGTAGAAGACATCCATCCTACTGTGCCAAATCCATATAACCTCCTTAGCACCCCTCCC
 241▶ nLysArgValGluAspIleHisProThrValProAsnProTyrAsnLeuLeuSerThrLeuPr
 2521 GCCGTCTCACCCCTTGGTACACTGTCCTAGATTTAAAGGACGCTTTTTTCTGCCTGCGACTACA
 262▶ oProSerHisProTrpTyrThrValLeuAspLeuLysAspAlaPhePheCysLeuArgLeuHi
 2584 CTCTGAGAGTCAGTTACTTTTTGCATTTGAATGGAGAGATCCAGAAATAGGACTGTCAGGGCA
 283▶ sSerGluSerGlnLeuLeuPheAlaPheGluTrpArgAspProGluIleGlyLeuSerGlyGl
 2647 ACTAACCTGGACACGCCCTCCTCAGGGGTTCAAGAATAGCCCCACCCTATTTGATGAGGCCCT
 304▶ nLeuThrTrpThrArgLeuProGlnGlyPheLysAsnSerProThrLeuPheAspGluAlaLe
 2710 GCACTCAGACCTGGCCGATTTTCAGGGTAAGGTACCCGGCTCTAGTCCTCCTACAATATGTAGA
 325▶ uHisSerAspLeuAlaAspPheArgValArgTyrProAlaLeuValLeuLeuGlnTyrValAs
 2773 TGACCTCTTGCTGGCTGCGGCAACCAGGACTGAATGCCTGGAAGGGACTAAGGCACTCCTTGA
 346▶ pAspLeuLeuLeuAlaAlaAlaThrArgThrGluCysLeuGluGlyThrLysAlaLeuLeuGl
 2836 GACTTTGGGCAATAAGGGGTACCGAGCCTCTGGAAAGAAGGCCCAAATTTGCCTGCAAGAAGT
 367▶ uThrLeuGlyAsnLysGlyTyrArgAlaSerGlyLysLysAlaGlnIleCysLeuGlnGluVa
 2899 CACATACCTGGGGTACTCTTTAAAAGATGGCCAAAGGTGGCTTACCAAAGCTCGGAAAGAAGC
 388▶ lThrTyrLeuGlyTyrSerLeuLysAspGlyGlnArgTrpLeuThrLysAlaArgLysGluAl
 2952 CATCCTATCCATCCCTGTGCCTAAAAACCCACGACAAGTGAGAGAGTTCCCTTGGAACTGCAG
 409▶ aIleLeuSerIleProValProLysAsnProArgGlnValArgGluPheLeuGlyThrAla

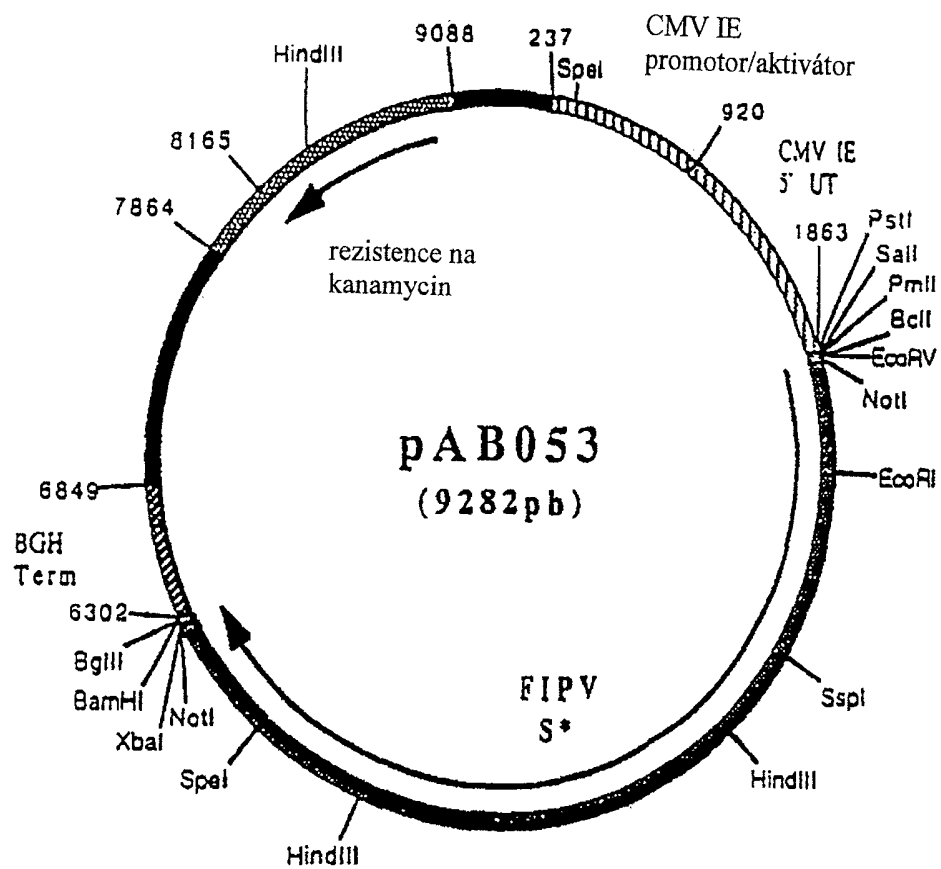
Obr. 5 - pokračování



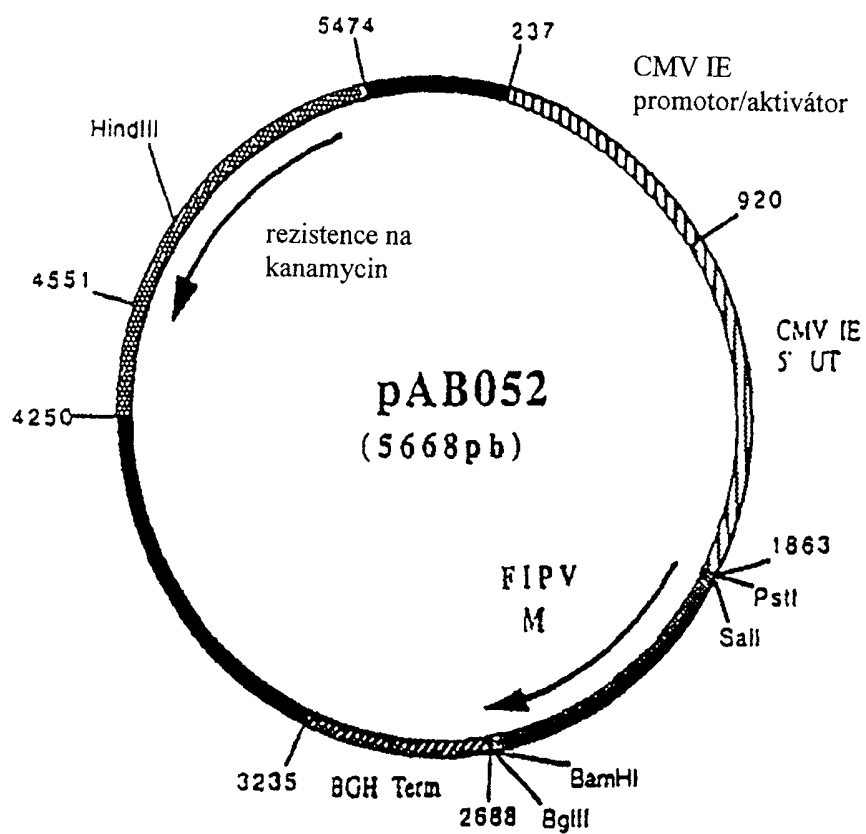
Obr. 6



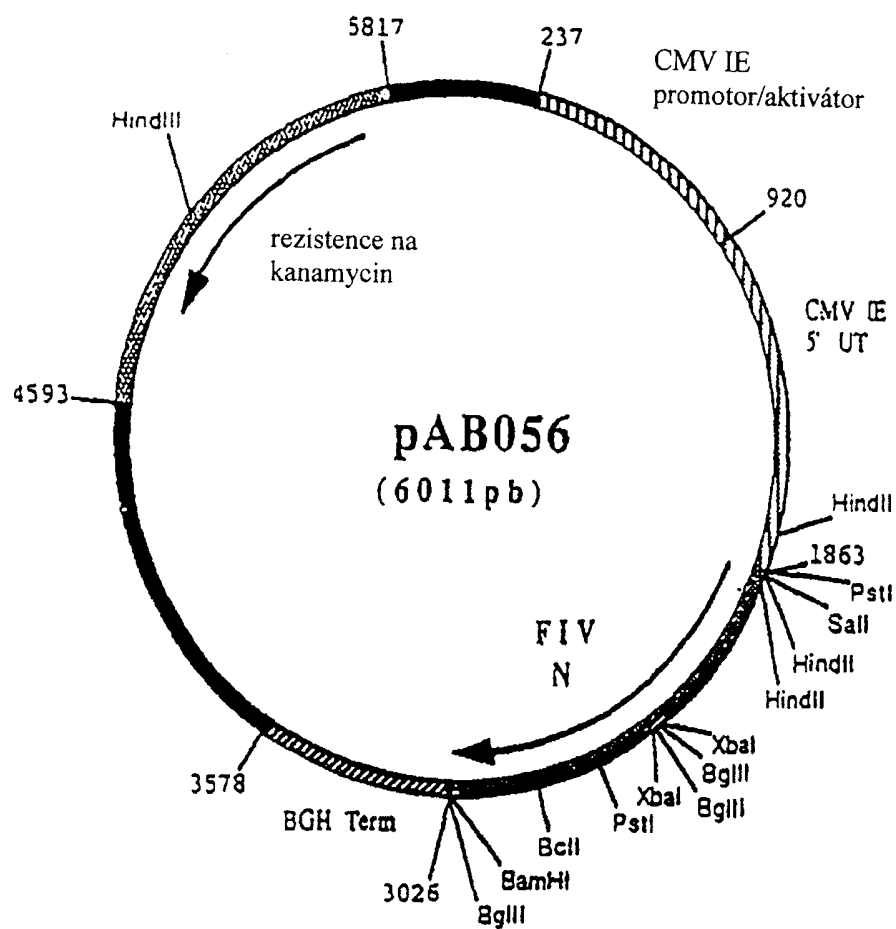
Obr. 7



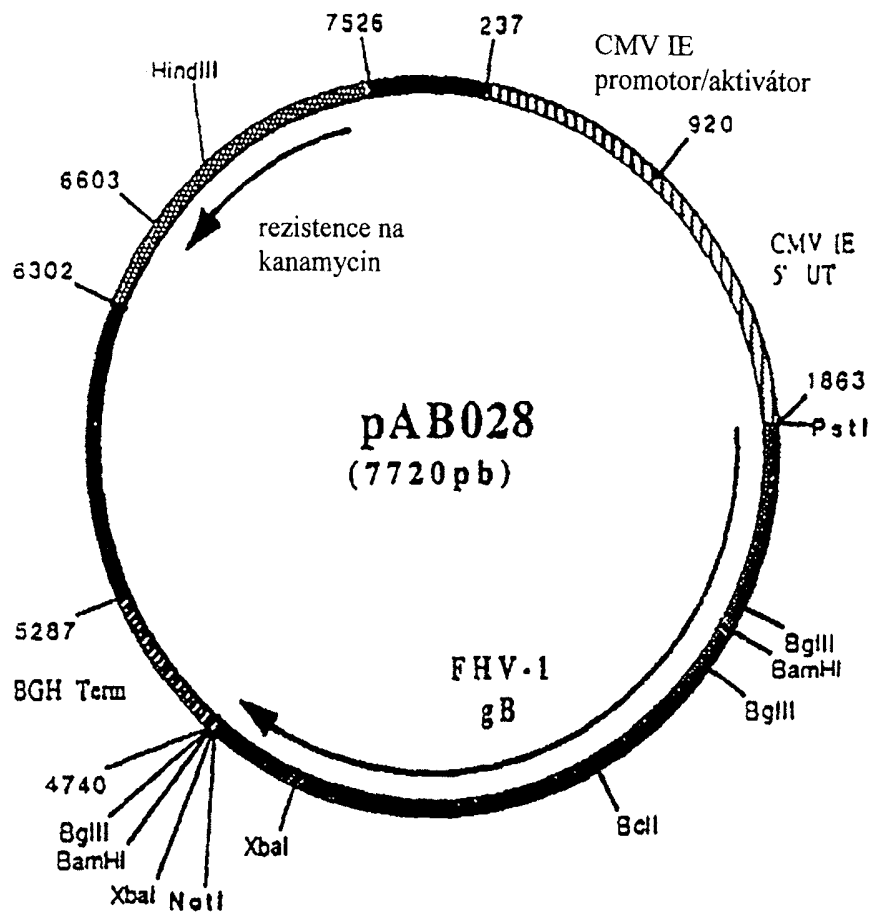
Obr. 8



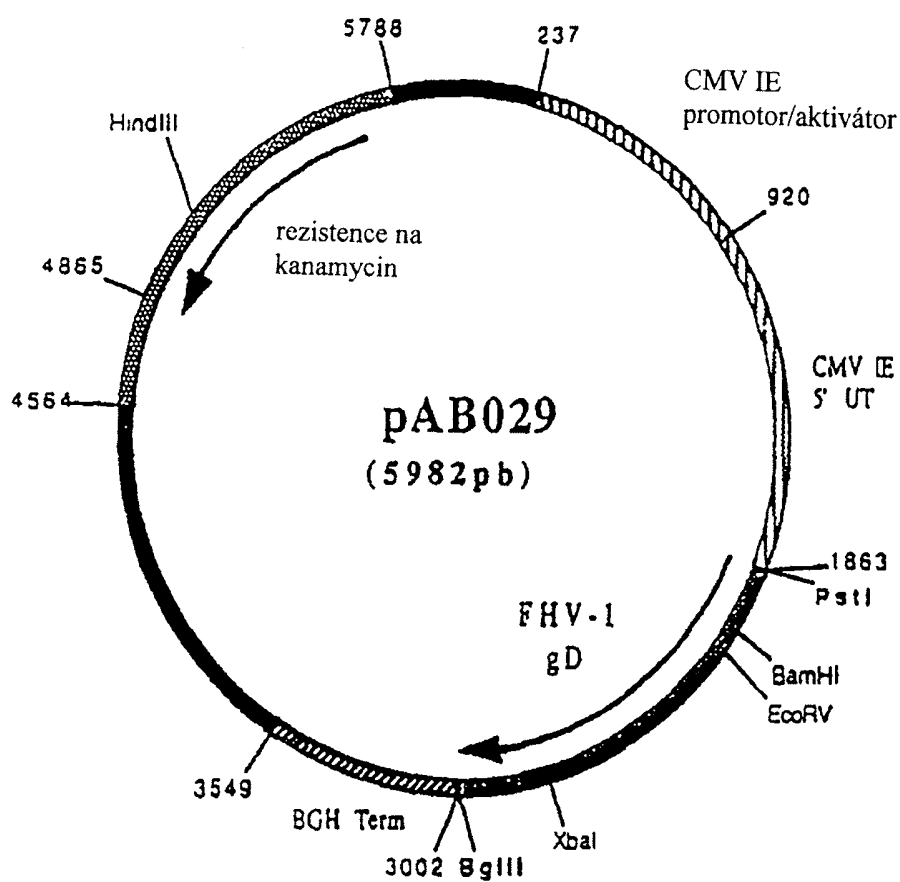
Obr. 9



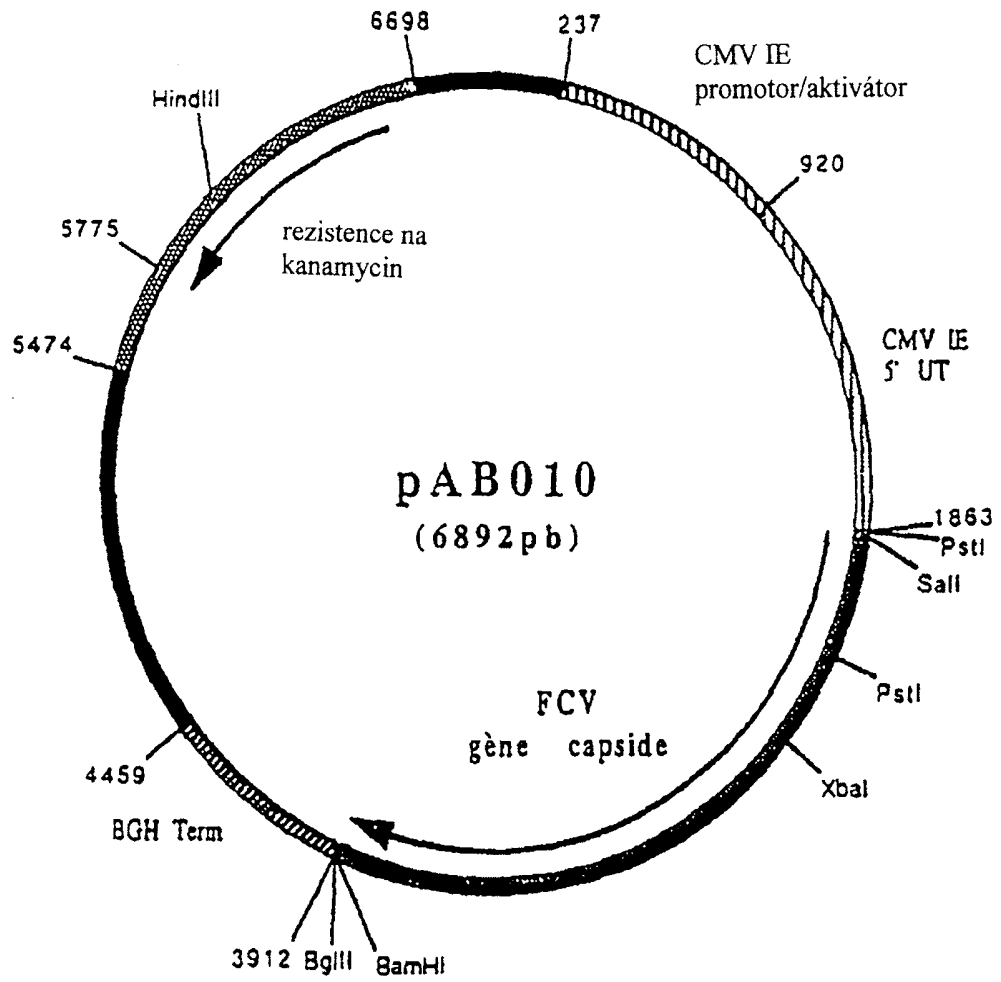
Obr. 10



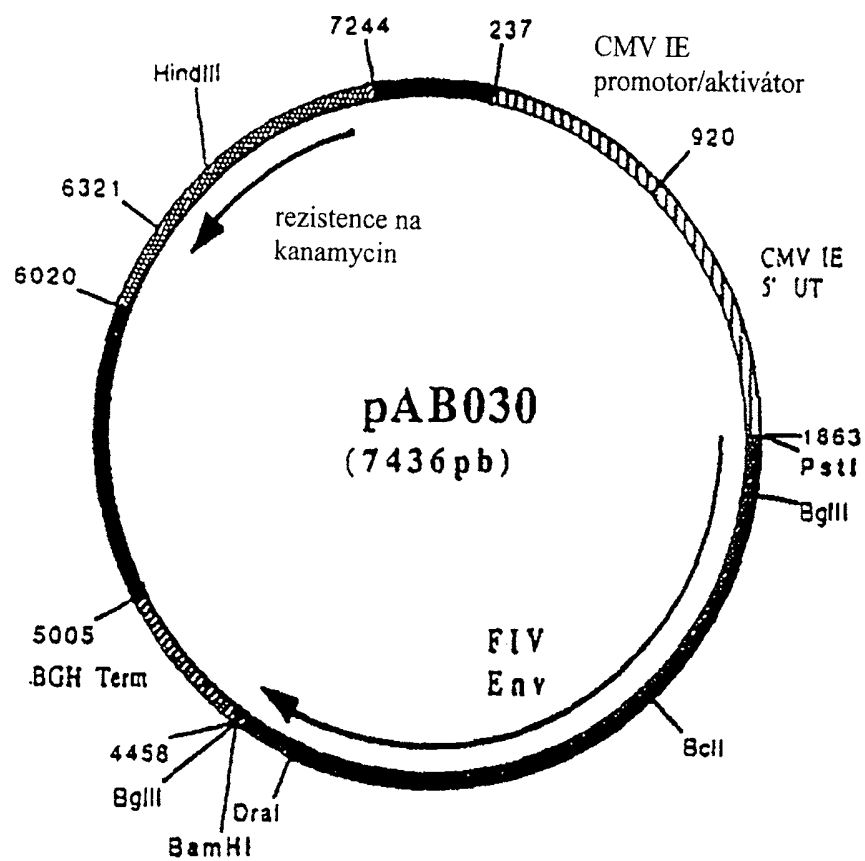
Obr. 11



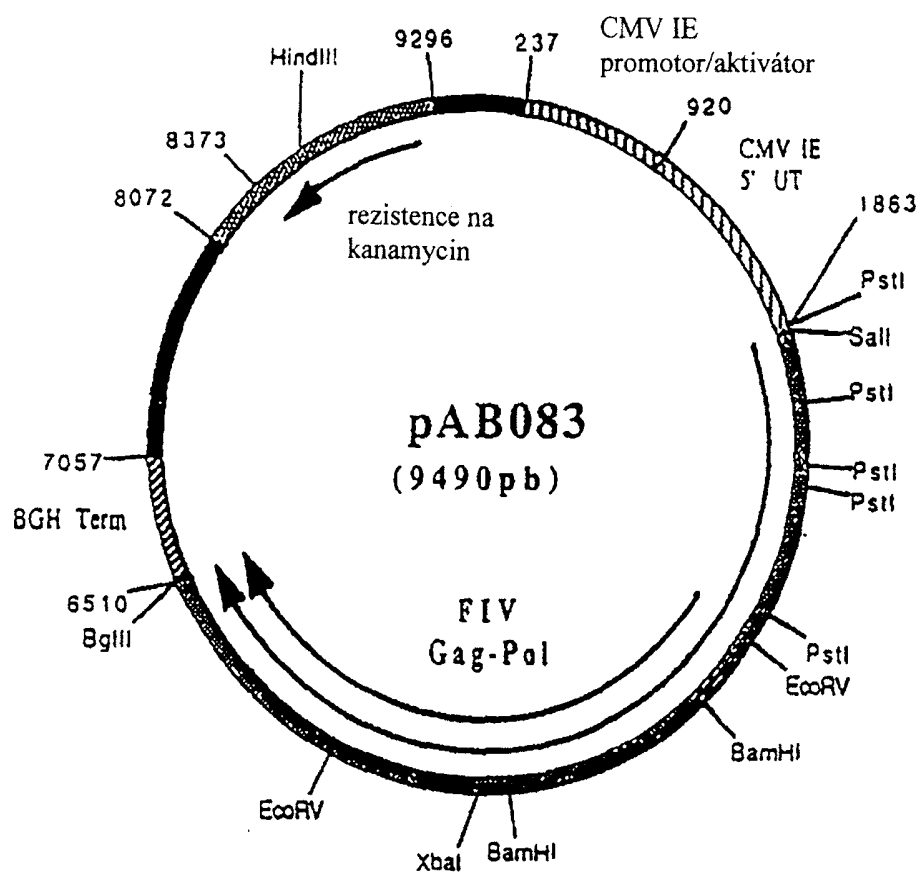
Obr. 12



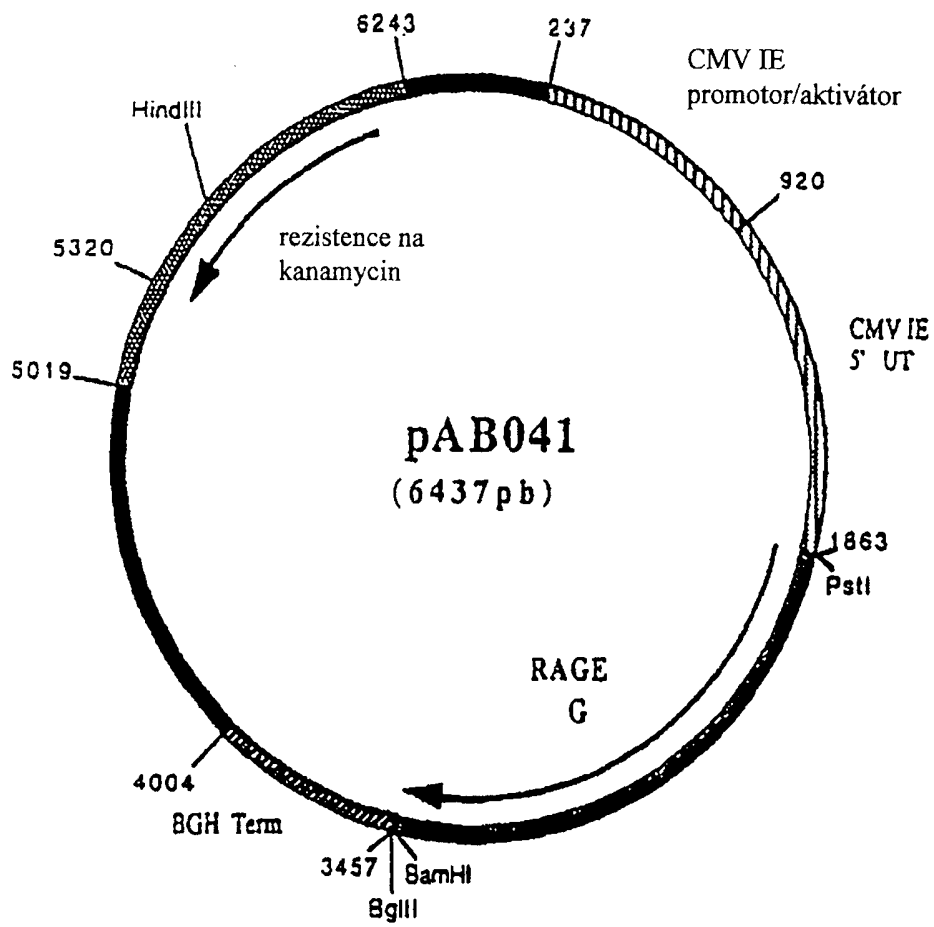
Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16

Konec dokumentu
