

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 800

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-2706**
(22) Přihlášeno: **05.04.2002**
(30) Právo přednosti: **06.04.2001 FR 2001 0104712**
(40) Zveřejněno: **17.12.2003**
(Věstník č. 12/2003)
(47) Uděleno: **10.02.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.03.2016**
(Věstník č. 12/2016)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/003810**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/081513**

(56) Relevantní dokumenty:

Swiss-Prot: Q8VC33.1, 1. 3. 2002; Swiss-Prot: BC021911, 25. 1. 2002; Swiss-Prot: BG294111.1, 21. 2. 2001; Swiss-Prot: AC073678, 29. 6. 2000; Swiss-Prot: BC014127, 13. 9. 2001; Swiss-Prot: AK015847, 1999; Swiss-Prot: BC016199, 13. 11. 2001; Swiss-Prot: BC022521, 6. 2. 2002.

(73) Majitel patentu:

NOVARTIS AG, Basel, CH
Université de Strasbourg, Strasbourg, FR

(72) Původce:

Thierry Léveillard, Maisons Alfort, FR
José Alain Sahel, Paris, FR
Saddek Mohand-Said, Paris, FR
David Hicks, Strasbourg, FR

(74) Zástupce:

Ing. Jan Kubát, Přístavní 24, 170 00 Praha 7

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutická kompozice, způsob
diagnostiky retinální dystrofie,
rekombinantní polypeptid, způsob produkce
tohoto polypeptidu, rekombinantní
protilátka a její fragment**

(57) Anotace:

Vynález se týká farmaceutické kompozice obsahující terapeuticky účinné množství polypeptidu zvoleného ze souboru zahrnujícího SEKV. ID. č. 2, SEKV. ID. č. 4, SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8, SEKV. ID. č. 10, SEKV. ID. č. 12 a SEKV. ID. č. 14 a farmaceuticky přijatelný nosič, způsobu diagnostiky retinální dystrofie u člověka, rekombinantního polypeptidu, způsobu produkce tohoto polypeptidu, jakož i rekombinantní protilátka a jejího fragmentu.

CZ 305800 B6

Farmaceutická kompozice, způsob diagnostiky retinální dystrofie, rekombinantní polypeptid, způsob produkce tohoto polypeptidu, rekombinantní protilátka a její fragment

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká přípravků pro detekci a léčbu degenerativních chorob sítnice. Konkrétně se vynález týká proteinu, který chrání proti degeneraci čípků, molekul nukleové kyseliny, které kódují takový protein, protilátky, které rozpoznávají protein a způsobů diagnostiky degenerativních chorob sítnice.

Dosavadní stav techniky

15 Fotoreceptory jsou specializovanou podmnnožinou neuron sítnice (retiny), které zodpovídají za vidění. Fotoreceptory se skládají z tyčinek a čípků, což jsou fotosenzitivní buňky sítnice. Každá tyčinka a čípek vytváří specializovanou řasinku, nazývanou vnější segment, kde sídlí fototransdukční aparát. Tyčinky obsahují specifický vizuální pigment absorbující světlo, rodopsin. U lidí existují tři skupiny čípků, charakterizované expresí rozdílných vizuálních pigmentů: čípek pro modrý pigment, čípek pro zelený pigment a čípek pro červený pigment. Každý typ proteinu vizuálního pigmentu je přizpůsoben tak, aby maximálně absorboval světlo v různých vlnových délkách. Rodopsin tyčinek zprostředkovává skotopické vidění (za šera), zatímco čípkové pigmenty zodpovídají za fotopické vidění (v jasném světle). Červený, modrý a zelený pigment také tvoří základ barevného vidění u lidí. Vizuální pigmenty v tyčinkách a čípcích reagují na světlo a vytvářejí akční potenciál ve výstupních buňkách, tyčinkových bipolárních neuronů, který je pak přenášen gangliovými neurony sítnice za vzniku vizuálních podnětů ve zrakové kůře.

U lidí velký počet chorob sítnice zahrnuje progresivní degeneraci a eventuální úmrtí fotoreceptorů, vedoucí neúprosně ke slepotě. Degenerace fotoreceptorů, jako například dědičnými retinálními dystrofiemi (např. retinitis pigmentosa), makulární degenerace se vztahem k věku a další makulopatie nebo odchlípení sítnice, jsou všechny charakterizovány progresivní atrofií a ztrátou funkce vnějších segmentů fotoreceptorů. Kromě toho úmrtí fotoreceptorů nebo ztráta fotoreceptční funkce má za následek parciální deafferentaci retinálních neuronů druhého řádu (bipolárních buněk tyčinek a horizontálních buněk) u pacientů s retinální dystrofií, proto klesá celková účinnost propagace elektrického signálu tvořeného fotoreceptory. Sekundární změny gliového a pigmentového epitelu sekundární k degeneraci fotoreceptorů má za následek vaskulární změny vedoucí k ischemii a glióze. Trofické faktory, které jsou schopné zachránit fotoreceptory před buněčnou smrtí a/nebo obnovovat funkce dysfunkčních (atrofických nebo dystrofických) fotoreceptorů, mohou představovat použitelnou terapii na léčbu těchto chorobných stavů.

40 Progrese těchto chorobných stavů směřuje k následné ztrátě těchto dvou skupin fotoreceptorů: zpočátku jsou tyčinky ztráceny jako přímý důsledek genetické léze nebo léze způsobené vlivy prostředí nebo neznámého původu, což má za následek noční slepotu a redukci zorného pole následovanou nevyhnutelně ztrátou čípků vedoucí k celkové slepotě. Čípky umírají nepřímo, protože neprojevují primární lézi.

Ne všechny z genů spojených s retinální dystrofií už byly identifikovány. Identifikace takových genů by umožnila jak diagnostikovat onemocnění, tak poznat účinnou terapii.

50

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice obsahující terapeuticky účinné množství polypeptidu zvoleného ze souboru zahrnujícího SEKV. ID. č. 2, SEKV. ID. č. 4, SEKV. ID. č. 6,

SEKV. ID. č. 8, SEKV. ID. č. 10, SEKV. ID. č. 12 a SEKV. ID. č. 14 a farmaceuticky přijatelný nosič.

Výhodně uvedená farmaceutická kompozice obsahuje terapeuticky účinné množství nukleové kyseliny zvolené ze souboru sestávajícího ze SEKV. ID. č. 1 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 3 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 5 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 7 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 9 nebo její kódující oblasti a farmaceuticky přijatelný nosič.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob diagnostiky retinální dystrofie u člověka, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

–detekci in vitro nebo ex vivo transkripce mediátorové RNA transkribované z DNA kódující RDCVF1 nebo RDCVF2 cDNA, uvedené v SEKV. ID. č. 5 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 7 nebo její kódující oblasti nebo SEKV. ID. č. 13 nebo její kódující oblasti v oku člověka, přičemž snížená transkripce vzhledem k transkripci v oku individua netrpícího retinální dystrofií znamená, že uvedený člověk je diagnostikován jako trpící retinální dystrofií, nebo alternativně zahrnuje:

–měření in vitro nebo ex vivo množství polypeptidu RDCVF1 nebo RDCVF2 obsahujícího aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8 nebo SEKV. ID. č. 14 v tyčinkách oční sítnice člověka, přičemž přítomnost sníženého množství uvedeného polypeptidu vzhledem k množství polypeptidu v normální oční tkáni znamená, že uvedený člověk je diagnostikován jako trpící retinální dystrofií.

Předmětem vynálezu je rovněž rekombinantní polypeptid sestávající z aminokyselinové sekvence uvedené v SEKV. ID. č. 2 nebo z rekombinantního polypeptidu kódovaného nukleotidovou sekvencí SEKV. ID. č. 1 nebo její kódující oblasti, nebo sestávající z aminokyselinové sekvence uvedené v SEKV. ID. č. 4 nebo z rekombinantního polypeptidu kódovaného nukleotidovou sekvencí SEKV. ID. č. 3 nebo její kódující oblasti.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob produkce uvedeného RDCVF polypeptidu obsahující: kultivaci hostitelské buňky obsahující inkorporovaný expresní vektor obsahující exogenně–odvozený polynukleotid kódující uvedený polypeptid za podmínek dostatečných k expresi uvedeného polypeptidu v hostitelské buňce, čímž dojde k produkci exprimovaného polypeptidu, a izolaci polypeptidu produkovaného buňkou.

Předmětem vynálezu je rekombinantní protilátka nebo její fragment, který specificky váže aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEKV. ID. č. 2, SEKV. ID. č. 4, SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8, SEKV. ID. č. 10, SEKV. ID. č. 12 nebo SEKV. ID. č. 14.

Výhodně je uvedeným fragmentem protilátky fragment Fab nebo F(ab')₂.

Výhodně je uvedenou rekombinantní protilátkou monoklonální protilátka.

Další předměty, rysy, výhody a aspekty předkládaného vynálezu budou zřejmé odborníkům z následujícího podrobného popisu. Je třeba připomenout, že následující popis a specifické příklady ukazující výhodná provedení vynálezu jsou pouze ilustrační a rozsah vynálezu nijak neomezují. Různé změny a modifikace, aniž by došlo k odchýlení od vynálezecké myšlenky a rozsahu popsaného vynálezu, budou odborníkovi zřejmé na základě předloženého popisu, příkladů, obrázků a nároků.

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Myší nukleotidová sekvence Rdcvf1 z expresní klonování a myší aminokyselinová sekvence RdCVF1.

Obrázek 2: Myší nukleotidová sekvence Rdcvf1L a odpovídající aminokyselinová sekvence.

Obrázek 3: Humánní Rdcvf1 a humánní aminokyselinová sekvence Rdcvf1.

Obrázek 4: Humánní nukleotidová sekvence Rdcvf1L a humánní aminokyselinová sekvence Rdcvf1L.

5 Obrázek 5: Myší nukleotidová sekvence Rdcvf2 myší aminokyselinová sekvence Rdcvf2.

Obrázek 6: Myší nukleotidová sekvence Rdcvf2L a myší aminokyselinová sekvence Rdcvf2L.

Obrázek 7: Humánní nukleotidová sekvence Rdcvf2 a humánní aminokyselinová sekvence Rdcvf2.

10 Obrázek 8: ukazuje porovnání aminokyselinových sekvencí krátkých forem Rdcvf (SEKV. ID. Č. 2, 6, 10 a 14) a dlouhých forem Rdcvf (SEKV. ID. Č. 4, 8, 12 a 14).

Obrázek 9 ukazuje oligonukleotidové primery pro GST-Rdcvf1.

Obrázek 10: Vícenásobné porovnání RDCVF1/RDCVF2.

Obrázek 11: Srovnání myší a humánní sekvence RDCVF2.

15 Obrázek 12: Vícenásobné porovnání myšího Rdcv2 s EST klony be552141, bi517442, bg707818 a bi603812.

Obrázek 13: Vícenásobné porovnání Rdcvf1 a EST klony bg299078, ai716631, bg294111, be108041 a bg395178.

Obrázek 14: EST sekvence bg299078 upravená na nejvyšší shodu („match“) s Rdcvf1.

Obrázek 15: EST sekvence bg294111 upravená na nejvyšší shodu s Rdcvf1L.

20 Obrázek 16: RT-PCR analýza v reálném čase exprese arrestinu tyčinek (A) a RdCSF1 (B) v sítnici ve stáří 5 týdnů u C57BL/6@N (zelená) a C3H/HE@N (červená).

Obrázek 17: RT-PCR analýza ukazující, že Rdcvf2 je exprimován způsobem závislým na tyčinkách a je exprimován v jiné části CNS.

25 Obrázek 18: PCR analýza ukazující, že RdCVF1 je exprimován způsobem závislým na tyčinkách.

Podrobný popis vynálezu

30 Všechny v tomto textu citované patentové přihlášky, patenty a další literatura jsou tímto v plném rozsahu zahrnuty formou odkazu.

Při realizaci předkládaného vynálezu se užívají běžné metody molekulární biologie, mikrobiologie a rekombinantní DNA. Tyto metody jsou odborníkům dobře známy a byly popsány například v Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I, II, a III, 1997 (F. M. Ausubel ed.);
 35 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames and Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames and Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells to
 40 Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); and Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds.).

45 Termín „diferenčně exprimovaný gen“ užívaný v předkládaném textu se týká (a) genu, který obsahuje alespoň jednu z DNA sekvencí popsaných v tomto textu (např. sekvence na obr. 1 a SEKV. ID. Č. 1 nebo sekvence na obr. 2 a SEKV. ID. Č. 3), (b) jakékoliv DNA sekvence, která

kóduje aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí popsanou v tomto textu (např. sekvence na obr. 1 a SEKV. ID. Č. 2 nebo sekvence na obr. 2 a SEKV. ID. Č. 4) nebo (c) jakékoli DNA sekvence, která je v podstatě podobná kódující sekvenci popsané v tomto textu.

- 5 Termín „v podstatě podobná“, ve svém nejširším významu, jak se používá v tomto textu, pokud se týká nukleotidové sekvence, znamená nukleotidovou sekvenci odpovídající referenční nukleotidové sekvenci, kde odpovídající sekvence kóduje polypeptid mající v podstatě stejnou strukturu a funkci jako polypeptid kódovaný referenční nukleotidovou sekvencí, např. kde změny aminokyselin, které se vyskytují, nepostihují funkci polypeptidu. Je žádoucí, aby v podstatě podobná
- 10 nukleotidová sekvence kódovala polypeptid kódovaný referenční nukleotidovou sekvencí. Procento identity mezi v podstatě podobnou nukleotidovou sekvencí a referenční nukleotidovou sekvencí by mělo být alespoň 90 %, výhodněji alespoň 95 %, ještě výhodněji alespoň 99 %. Srovnání sekvencí je prováděno s použitím Smith–Watermanova algoritmu pro porovnávání sekvencí (viz např. Waterman, M. S. Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and
- 15 genomes. Chapman & Hall. London: 1995. ISBN 0–412–99391–0, nebo viz také <http://www-hto.usc.edu/software/seqaln/index.html>. program LocalS, verze 1,16, byl použit s následujícími parametry: Shoda („match“): 1, penalta za záměnu: 0,33, penalta za otevřenou mezeru: 2, penalta za rozšířenou mezeru: 2. Nukleotidová sekvence „v podstatě podobná“ referenční nukleotidové sekvenci hybridizuje s referenční nukleotidovou sekvencí v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS),
- 20 0,5M NaPO₄, 1mM EDTA v 50 °C, po promytí v 2X SSC, 0,1% SDS v 50 °C, nebo výhodněji v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄, 1mM EDTA v 50 °C, po promytí v 1X SSC, 0,1% SDS v 50 °C, nebo ještě výhodněji v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄, 1mM EDTA v 50 °C, po promytí v 0,5X SSC, 0,1% SDS v 50 °C, výhodně v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄, 1mM EDTA v 50 °C s promytím v 0,1X SSC, 0,1% SDS v 50 °C,
- 25 výhodněji v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄, 1mM EDTA 50 °C s promytím v 0,1X SSC, 0,1% SDS v 65 °C, přičemž stále kóduje funkčně rovnocenný genový produkt.

- Diferenčně exprimované geny popsané v tomto textu jsou exprimovány v oční tkáni a konkrétně v tyčinkách (tyčinkových buňkách), nicméně u člověka postiženého retinální dystrofií, jako například onemocnění retinitis pigmentosa, makulární degenerace se vztahem k věku, Bardetův–Biedlův syndrom, Bassenův–Kornzweigův syndrom, Bestova nemoc, chloroidom, spirálovitá atrofie, kongenitální amauroza, Refsumův syndrom, Stargardtova nemoc a Usherův syndrom, se tvoří v menším množství než v odpovídající tkáni u lidí, kteří netrpí retinální dystrofií. Mediátová RNA (mRNA) transkribovaná z diferenčně exprimovaných genů a proteiny translatované z
- 35 této mRNA, jsou přítomny tyčinkové tkáni a/nebo spojeny s takovými tkáněmi v množství nejvýše přibližně polovina, výhodně nejvýše pětkrát menším, výhodněji nejvýše desetkrát, nejvýhodněji nejvýše 100krát menším než jsou hladiny mRNA a proteinu zjištěné v odpovídajících tkáních u lidí, kteří netrpí retinální dystrofií. Takové snížení transkripce Rdcvf1 nebo Rdcvf2 mRNA je nazýváno v tomto textu jako „snížená transkripce“.

- 40 Termín „hostitelská buňka“ jak se v tomto textu používá, se týká prokaryotické nebo eukaryotické buňky, která obsahuje heterologní DNA, která byla do buňky vnesena kteroukoliv ze známých metod, např., elektroporací, precipitací s fosforečnanem vápenatým, microinjekcí, transformací, virovou infekcí apod.

- 45 Termín „heterologní“ znamená totéž co „odlišného přírodního původu“ nebo představuje „nepřirodní“ stav (stav nevyskytující se v přírodě). Například jestliže hostitelská buňka je transformovaná DNA nebo genem pocházejícím z jiného organismu, konkrétně jiného biologického druhu, pak je gen heterologní ve vztahu k hostitelské buňce, a také k potomstvu hostitelské buňky, které nese tento gen. Podobně se termín heterologní týká nukleotidové sekvence pocházející z téhož organismu, do kterého je pak vložena, ale která je přítomna v „nepřirodním“ stavu, např. v odlišném počtu kopií nebo pod kontrolou odlišných regulačních prvků, ve srovnání se stavem, v jakém se vyskytuje v přírodě.

Vektorová molekula je molekula nukleové kyseliny, do které může být vložena heterologní nukleová kyselina, a která pak může být vložena do vhodné hostitelské buňky. Vektory výhodně mají jeden nebo více replikačních počátků a jedno nebo více míst, do kterého může být vložena rekombinantní DNA. Vektory často obsahují výhodné prostředky, jejichž pomocí mohou být buňky obsahující vektory odlišeny od buněk, které vektor neobsahují, např. kódují geny rezistence k léčivům. K obvyklým vektorům patří plazmidy, viry a (primárně v kvasinkách a bakteriích) tzv. „umělé chromozómy“.

„Plazmidy“, obecně označované v tomto textu názvem, kterému předchází písmeno malé p, a pak následují zpravidla velká písmena a/nebo čísla, v souladu s mezinárodní konvencí o názvech, jsou odborníkům dobře známy. Plazmidy popsané v tomto textu jsou buďto komerčně dostupné, veřejně dostupné bez omezení nebo mohou být zkonstruovány z dostupných plazmidů rutinní aplikací dobře známých postupů, které byly publikovány. Mnohé plazmidy a další klonovací a expresní vektory, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu, jsou odborníkům známy a jsou pro ně snadno dostupné. Navíc odborník snadno může zkonstruovat rutinním postupem libovolný počet dalších plazmidů, které budou vhodné pro použití ve vynálezu. Vlastnosti, konstrukce a použití takových plazmidů, a také dalších vektorů v předkládaném vynálezu je odborníkům jasné z předloženého popisu.

Termín „izolovaná“ znamená, že látka je odstraněna ze svého původního prostředí (např. přírodního prostředí, jestliže se normálně vyskytuje v přírodě). Například v přírodě se vyskytující polynukleotid nebo polypeptid přítomný v žijícím zvířeti není izolovaný, ale stejný polynukleotid nebo polypeptid, oddělený od některých nebo všech látek, se kterými se v přírodním systému společně vyskytoval, je považován za izolovaný, a to dokonce i v takovém případě, jestliže byl následně znovu vnesen do přírodního systému. Tak izolované polynukleotidy mohou být částí vektoru a/nebo izolované polynukleotidy nebo polypeptidy mohou být částí kompozice nebo přípravku, a přitom jde stále o izolované látky, neboť vektor nebo kompozice nejsou přírodním prostředím.

Termín „transkripční kontrolní sekvence“ se týká DNA sekvence, jako například iniciační sekvence, enhancerové (zesilovací) sekvence a promotorové sekvence, které indukují, zesilují, potlačují nebo jinak regulují transkripci sekvence nukleové kyseliny kódující protein, ke které jsou operativně připojeny.

Termíny „transkripční kontrolní sekvence Rdcvf1“ nebo „transkripční kontrolní sekvence Rdcvf2“ označují jakékoliv z transkripčních kontrolních sekvencí, které se normálně nacházejí asociované se savčím genem Rdcvf1 nebo Rdcvf2, výhodně s genem Rdcvf2 v myším nebo humánním genomu.

Termín „transkripční kontrolní sekvence jiného než lidského původu“ se týká jakékoliv transkripční kontrolní sekvence nevyskytující se v humánním genomu.

Termín „polypeptid“ se užívá v tomto textu zaměnitelně s termíny „polypeptidy“ a „protein“ a „proteiny“.

Termín „chemický derivát“ polypeptidu podle vynálezu, jak se v tomto textu používá, označuje polypeptid podle vynálezu, který obsahuje další chemické skupiny, které nejsou normálně částí molekuly. Takové skupiny mohou např. zlepšit rozpustnost molekuly, absorpci, biologický polčas apod. Skupiny může alternativně snížit toxicitu molekuly, vyloučit nebo zmírnit nežádoucí vedlejší účinky molekuly apod. Skupiny schopné zprostředkovat takové účinky byly popsány například v Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980).

Termín „neuroprotektivní agens“ označuje v kontextu předkládaného popisu sloučeninu, která zabraňuje degeneraci neuronových buněk nebo chrání neuronové buňky před degenerací. Podob-

ně „retinoprotektivní agens“ je sloučenina, která zabraňuje degeneraci buněk sítnice (retiny) nebo chrání buňky sítnice před degenerací.

Vynález zahrnuje molekuly nukleové kyseliny, výhodně DNA molekuly, jako například (1) izolované molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci uveden v SEKV. ID. Č. 1 nebo SEKV. ID. Č. 3, (2) izolované molekuly nukleové kyseliny, které obsahují sekvence nukleové kyseliny, která hybridizuje s izolovanou DNA uvedenou jako SEKV. ID. Č. 1 nebo SEKV. ID. Č. 3 a (3) sekvence nukleové kyseliny, která hybridizuje s (1) nebo (1). Tyto hybridizační podmínky mohou být velmi přísné nebo méně přísné. V příkladech, kde molekuly nukleové kyseliny jsou deoxyoligonukleotidy („oligos“), jsou doporučeny vysoce přísné podmínky např. promytí v 6X SSC/0,05% difosforečnan sodný ve 37 °C (pro oligonukleotid sestávající ze 14 bází), 48 °C (pro oligo ze 17 bází), 55 °C (pro oligo ze 20 bází) a 60 °C (pro oligo ze 23 bází). Vhodné rozsahy takových přísných podmínek pro nukleové kyseliny odlišného složení jsou popsány v publikaci: Krause and Aaronson (1991) *Methods in Enzymology*, 200:546–556 in addition to Maniatis et al. (citováno výše).

Tyto molekuly nukleové kyseliny mohou působit jako antisense molekuly na cílový gen, a jsou použitelné například k regulaci cílového genu a/nebo jako antisense primery v amplifikační reakci sekvence nukleové kyseliny cílového genu. Dále taková sekvence může být použita jako část ribozymu a/nebo trojšroubovicové molekuly, která je také použitelná pro regulaci cílového genu. A dále tyto molekuly mohou být použity jako složky diagnostických postupů, kdy je detekována přítomnost alely RdCVF1 nebo RdCVF2, která je příčinou nemoci.

Vynález také zahrnuje (a) vektory, který obsahují kteroukoliv z předcházejících kódujících sekvencí (tj. sense sekvence) a/nebo k nim komplementárních sekvencí (tj. antisense sekvence), (b) expresní vektory, které obsahují kteroukoliv z předcházejících kódujících sekvencí operativně spojenou s regulačním prvkem, který řídí expresi kódující sekvence, a (c) geneticky modifikované hostitelské buňky, které obsahují kteroukoliv z předcházejících kódujících sekvencí operativně spojenou s regulačním prvkem, který řídí expresi kódující sekvence v hostitelské buňce. Jak se v tomto textu používá, regulační prvky zahrnují, ale bez omezení, indukovatelné a neindukovatelné promotory, enhancery (zesilující elementy), operátory a další elementy řídící a regulující expresi, které jsou odborníkům známy.

Vynález dále zahrnuje fragmenty kterýkoliv sekvencí nukleových kyselin popsanych v tomto textu. Fragmenty úplného „full-length“ Rdcvf1 nebo Rdcvf2 genu mohou být použity jako hybridizační sonda pro cDNA knihovnu k izolaci kompletního genu a k izolaci dalších genů, které mají vysokou sekvenční podobnost s Rdcvf1 nebo Rdcvf2 gen a podobnou biologickou aktivitu. Sondy tohoto typu mají výhodně alespoň 30 bází, a obsahují například přibližně od 30 do přibližně 50 bází, přibližně 50 až přibližně 100 bází, přibližně 100 až přibližně 200 bází nebo více než 200 bází (např. 300). Sonda může také být použita k identifikaci cDNA klonu odpovídajícího kompletnímu transkriptu genomového klonu, nebo klonu, který obsahuje kompletní Rdcvf1 nebo Rdcvf2 gen včetně regulačního a promotorového úseku, exonů a intronů. Příklad screeningu zahrnuje izolaci kódujícího úseku Rdcvf1 nebo Rdcvf2 genu tak, že se použije známá DNA sekvence pro syntézu oligonukleotidové sondy nebo se užije postup s náhodným primerem a izolovaná sekvence popsaná na obrázku 1 až 8. Značené oligonukleotidy mající sekvence komplementární k sekvenci genů podle předkládaného vynálezu se použijí pro screening knihovny humánní cDNA nebo genomové DNA k určení, který individuální klon knihovny hybridizuje se sondou.

Kromě genových sekvencí popsanych výše mohou být identifikovány také orthology těchto sekvencí, které mohou být například přítomny u jiného biologického druhu, a mohou být pak snadno izolovány, rutinními molekulárně biologickými postupy, které jsou známy v oboru, bez nepřiměřeného experimentování. Dále mohou existovat geny v jiných genetických lokusech v genomu, které kódují proteiny, které mají rozsáhlou homologii (homologie) s jednou nebo více doménami genových produktů podle vynálezu. Tyto geny mohou být také identifikovány podobnými postupy. Příklady orthologů nebo homologů jsou poskytovány na obr. 8, 10, 11, 12 a 13.

Například izolovaná exprimovaná genová sekvence může být značena a použita ke screeningu cDNA knihovny konstruované z mRNA získané z požadovaného organismu. Hybridizační podmínky budou s nižší stringencí, když cDNA knihovna byla získána z organismu odlišného od organismu, ze kterého pochází značená sekvence. Jinak může být značený fragment použit ke screeningu genomových knihoven pocházejících z požadovaného organismu, a sice také s použitím podmínek přiměřeně nízké stringence. Takové podmínky nízké stringence jsou dobře známé odborníkům a předvídatelně se mění v závislosti fylogenezi specifických organismů, ze kterých byla získána knihovna a značená sekvence. Pro instrukce ohledně volby vhodných podmínek, viz například Sambrook et al. (cit. výše).

Dále, dříve neznámá exprimovaná sekvence typu genu může být izolována pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) s použitím dvou degenerovaných oligonukleotidových primerových poolů, navržených na základě aminokyselinové sekvence požadovaného genu. Templát pro reakci může být cDNA získaná reverzní transkripcí z mRNA připravené z buněčné linie nebo tkáně humánního nebo jiného než humánního původu, o které je známo nebo o které se domníváme, že exprimuje homolog nebo sestřihovou variantu.

PCR produkt může být subklonován a sekvencován, aby se zajistilo, že amplifikovaná sekvence představuje sekvenci exprimované genu podobné sekvence nukleové kyseliny. PCR fragment může pak být použit pro izolaci klonu kompletní cDNA celou řadou metod. Například amplifikovaný fragment může být značena použit pro screening bakteriofágové cDNA knihovny. Alternativně značený fragment může být použit pro screening genomové knihovny.

PCR technika může také být použita k izolaci kompletní cDNA sekvence. Například může být izolována RNA, a sice standardní postupy, z vhodného buněčného nebo tkáňového zdroje. Reverzní transkriptázová reakce může být provedena na RNA s použitím oligonukleotidového primeru specifického pro 5' konec amplifikovaného fragmentu jako očka pro syntézu prvního vlákna. Výsledný RNA/DNA hybrid může pak být doplněn guaniny s použitím standardní reakce s terminální transferázou, hybrid může být štěpen Rnázou H a syntéza druhého vlákna pak může být zahájena prostřednictvím poly-C primeru jako očka. Takže cDNA sekvence v protisměru („upstream“) od amplifikovaného fragmentu může být snadno izolována. Pro přehled klonování strategii, které mohou být použity, viz např., Sambrook et al., 1989 (viz výše).

V případy, kdy identifikovaný diferenčně exprimovaný gen je normální gen nebo gen divokého typu, pak tento gen může být použit k izolaci mutantní alely genu. Taková izolace je výhodná u procesů a chorobných stavů, které jsou známy nebo podezřelé tím, že mají genetický základ. Mutantní alely mohou být izolovány z jednotlivců buďto známých nebo podezřelých z toho, že mají genotyp, který přispívá k symptomům onemocnění. Mutantní alely a produkty mutantních alel pak mohou být použity v diagnostických testovacích systémech popsanych níže.

cDNA mutovaného genu může být izolována, například tak, že se použije RT-PCR technika, která je dobře známa odborníkům. V takovém případě první cDNA vlákno může být syntetizováno hybridizační oligo-dT oligonukleotidu (nebo náhodných hexamerů) k mRNA izolované z tkáně známé nebo podezřelé tím, že se exprimuje v jedinci domněle nesoucím mutantní alelu, a dále extenzí nového vlákna reverzní transkriptázou. Druhé vlákno cDNA je pak syntetizováno s použitím oligonukleotidu, který hybriduje specificky k 5' konci normálního genu (nebo kterýmkoliv jiným známým způsobem). S použitím těchto dvou primerů je pak možné pomocí PCR amplifikovat celý produkt, klonovat do vhodného vektoru a podrobit ho DNA sekvenční analýze, a to metodami, které jsou dobře známy odborníkům. Porovnáním DNA sekvence mutovaného genu a normálního genu mohou být zjištěny mutace zodpovědné za ztrátu nebo změnu funkce mutovaného genového produktu.

Alternativně genomová nebo cDNA knihovna mohou být zkonstruovány a podrobeny screeningu s použitím DNA nebo RNA, z tkáně známé nebo podezřelé tím, že exprimuje požadovaný gen u jednotlivce, který domněle nese mutantní alelu. Normální gen nebo kterýkoliv jeho vhodný frag-

ment může pak být značen a použit jako sonda k identifikaci odpovídající mutantní alely v knihovně. Klon obsahující tento gen pak může být purifikován metodami rutinně užívanými v oboru a pak podroben sekvenční analýze, jak bylo popsáno výše.

- 5 A dále, expresní knihovny mohou být konstruovány s využitím DNA izolované nebo cDNA syntetizované z tkáně známé nebo podezřelé tím, že exprimuje požadovaný gen, z jedince, který je suspektně nositelem mutantní alely. Tímto způsobem jsou exprimovány genové produkty tvořené v domněle mutantní tkáni a ty mohou být dále podrobeny screeningu s použitím standardních metod užívajících protilátky vytvořené proti normálním genovým produktům, jak bude dále popsáno. (Metody screeningu viz např. například Harlow, E. and Lane, eds., 1988, „Antibodies: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor). V případech, kdy mutace vedou k expresi genového produktu se změněnou funkcí (např. v důsledku mutace bez smyslu („missence“)), soubor polyklonálních protilátek pravděpodobně bude zkříženě reagovat s mutovaným genovým produktem. Klony z knihovny identifikované prostřednictvím jejich reakce s takovými značenými protilátkami mohou být dále purifikovány a podrobeny sekvenční analýze, jak bylo popsáno výše.

- 20 Diferenčně exprimované genové produkty zahrnují proteiny kódované nukleotidovými sekvencemi uvedenými jako SEKV. ID. Č. 1, SEKV. ID. Č. 3, SEKV. ID. Č. 5, SEKV. ID. Č. 7, SEKV. ID. Č. 9, SEKV. ID. Č. 11 nebo SEKV. ID. Č. 13, konkrétně se jedná o polypeptid, který má nebo obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako SEKV. ID. Č. 2, SEKV. ID. Č. 4, SEKV. ID. Č. 6, SEKV. ID. Č. 8, SEKV. ID. Č. 10, SEKV. ID. Č. 12 nebo SEKV. ID. Č. 14 nebo jejich fragmenty.

- 25 Kromě toho, exprimované genové produkty zahrnují i proteiny, které představují funkčně rovnocenné genové produkty. Takový ekvivalentní genový produkt může obsahovat delece, adice nebo substituce aminokyselinových zbytků v aminokyselinové sekvenci kódované sekvencí diferenčně exprimovaného genu, popsaného výše, která ale vede k tzv. umlčené změně, takže je produkován funkčně rovnocenný diferenčně exprimovaný genový produkt (polymorfismy). Substituce aminokyselin může být provedena na základě podobnosti zúčastněných aminokyselinových zbytků v polaritě, náboji, rozpustnosti nebo hydrofobních, hydrofilních a/nebo amfipatických vlastností a na srovnání s aminokyselinovou sekvencí jiného biologického druhu.

- 35 Například nepolární (hydrofobní) aminokyseliny jsou alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylnalanin, tryptofan a methionin, polární neutrální aminokyseliny jsou glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin, pozitivně nabitě (bazické) aminokyseliny jsou arginin, lysin a histidin a záporně nabitě (kyselé) aminokyseliny jsou asparagová kyselina a glutamová kyselina.

- 40 Termín „funkčně ekvivalentní“ jak se v tomto textu používá, označuje protein nebo polypeptid schopný vykazovat v podstatě podobnou *in vivo* nebo *in vitro* aktivitu jako endogenní diferenčně exprimovaný genový produkt kódovaný diferenčně exprimovanou genovou sekvencí popsanou výše. Termín „funkčně ekvivalentní“ se týká také proteinů nebo polypeptidů schopných interakce s jinými buněčnými nebo extracelulárními molekulami způsobem podobným, kterým by reagovala odpovídající část endogenního diferenčně exprimovaného genového produktu. Například „funkčně ekvivalentní“ peptid by byl schopný v imunotestu snížit vazbu protilátky k odpovídajícímu peptidu (tj. peptidové aminokyselinové sekvenci, která byla modifikována, aby se získal „funkčně ekvivalentní“ peptid) endogenního proteinu nebo k endogennímu proteinu samotnému, když protilátka byla připravena proti odpovídajícímu peptidu endogenního proteinu. Ekvimolární koncentrace funkčně rovnocenného peptidu sníží výše zmíněnou vazbu odpovídajícího peptidu alespoň přibližně o 5 %, výhodně přibližně o 5 % až 10 %, výhodněji přibližně od 10 % do 25 %, dokonce ještě výhodněji přibližně o 25 % až 50 % a nejvýhodněji přibližně o 40 % až 50 %.

- 55 Diferenčně exprimované genové produkty mohou být připraveny užitím technologie rekombinantní DNA, která je odborníkům dobře známa. Takže jsou zde popsány způsoby přípravy poly-

peptidů a peptidů diferenčně exprimovaných genů podle vynálezu tím, že se exprimující nukleové kyseliny kódující diferenčně exprimované genové sekvence. Metody, které jsou odborníkům známé, mohou být použity ke konstrukci expresních vektorů obsahujících kódující sekvenci genu pro expresi proteinu a vhodné transkripční/translační kontrolní signály. Tyto metody zahrnují, například *in vitro* rekombinantní DNA techniky, syntetické techniky a *in vivo* rekombinaci/genetickou rekombinaci. Viz, například techniky popsané v publikaci Sambrook et al., 1989, (cit. výše) a Ausubel et al., 1989 (cit. výše). Alternativně RNA nebo cDNA schopná kódovat sekvenci genu pro expresi proteinu mohou být chemicky syntetizovány s použitím například automatických syntetizátorů. Viz například techniky popsané v publikaci „Oligonucleotide Synthesis“, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford, která je zahrnuta formou odkazu.

Celá řada systémů hostitel – expresní vektor může být použita pro expresi kódující sekvence diferenčně exprimovaného genu podle vynálezu. Takový systém hostitel – expresní vektor představuje vehikulum, jehož prostřednictvím může být požadovaná sekvence vytvořena a následovně purifikována, ale také představuje buňky, které mohou, když byly transformovány nebo transfekovány vhodnou nukleotidovou kódující sekvencí, *in situ* exprimovat protein diferenčně exprimovaného genu podle vynálezu. Patří k nim, ale bez omezení, mikroorganismy jako například bakterie (např. *E. coli*, *B. subtilis*) transformované rekombinantním bakteriofágovým, plazmidovým nebo kozmidovým DNA expresním vektorem, který obsahuje kódující sekvenci genu diferenčně exprimovaného proteinu, kvasinky (např. *Saccharomyces*, *Pichia*) transformované rekombinantním kvasinkovým expresním vektorem obsahujícím kódující sekvenci genu diferenčně exprimovaného proteinu, systémy hmyzích buněk infikovaných rekombinantním virovým expresním vektorem (např. bakulovirus) obsahujícím kódující sekvenci genu diferenčně exprimovaného proteinu, systémy rostlinných buněk infikovaných rekombinantním virovým expresním vektorem (např. virus mozaiky kvěťáku, CaMV, virus mozaiky tabáku, TMV) nebo transformované rekombinantním plazmidovým transformačním vektorem (např. Ti plazmid) obsahujícím kódující sekvenci genu diferenčně exprimovaného proteinu nebo systémy savčích buněk (např. buňky COS, CHO, BHK, 293, 3T3) nesoucí rekombinantní expresní konstrukty obsahující promotory pocházející z genomu savčích buněk (např., metalothioneinový promotor) nebo ze savčích virů (např. adenovirový pozdní promotor, 7,5K promotor viru vakcínie, promotor časných genů cytomegaloviru).

Exprese polypeptidu RDCVF1 nebo RDCVF2 buňkou z genu *Rdcvf1* nebo *Rdcvf2*, který je pro buňku nativní, může být také realizována. Metody vhodné pro takovou expresi byly popsány např. v patentech USA 5 641 670, 5 733 761, 5 968 502 a 5 994 127, které jsou výslovně zahrnuty formou odkazu v tomto textu. Buňky, které byly indukovány k expresi RDCVF1 nebo RDCVF2 metodami podle kteréhokoli z patentů USA 5 641 670, 5 733 761, 5 968 502 a 5 994 127, mohou být implantovány do požadované tkáně v žijícím zvířeti, aby se zvýšila lokální koncentrace RDCVF1 nebo RDCVF2 v tkáni.

V bakteriálních systémech lze výhodně vybrat celou řadu expresních vektorů pro expresi proteinu diferenčně exprimovaného genu v závislosti na zamýšleném použití. Například když má být produkováno velké množství takového proteinu, pro přípravu protilátek nebo screening peptidových knihoven, jsou výhodné například vektory, které regulují vysokou hladinu exprese fúzních proteinových produktů. K takovým vektorům patří, ale bez omezení, *E. coli* expresní vektor pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), ve kterém sekvence kódující protein diferenčně exprimovaného genu může být ligována individuálně do vektoru ve shodném čtecím rámci s kódujícím úsekem *lacZ* takže se vytvoří fúzní protein, pIN vektory (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101–3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503–5509). Mohou také být použity PGEX vektory exprimující cizorodé polypeptidy jako fúzní proteiny s glutathion-S-transferázou (GST). Obecně, takové fúzní proteiny jsou rozpustné a mohou být snadno purifikovány z lyzovaných buněk adsorpcí na glutathion-sefárové perličky následovanou elucí za přítomnosti volného glutathionu. PGEX vektory jsou navrženy tak, že obsahují štěpná místa trombinu nebo proteázy faktoru Xa, takže protein klonovaného cílového genu může být odštěpen od GST skupiny s použitím uvedených endopeptidáz.

Promotorové úseky mohou být vybrány z kterýchkoliv požadovaných genů použitím vektorů, které obsahují reportérovou transkripční jednotku postrádající promotorový úsek, jako například chloramfenikolacetyltransferázovou („CAT“) nebo luciferázovou transkripční jednotku, po směru („downstream“) od restrikčního místa nebo místa pro vložení zkoumaného promotorového fragmentu, tj. fragmentu, který může obsahovat promotor. Jak je dobře známo, vložení promotoru obsahujícího fragmentu do restrikčního místa vektoru v protisměru od CAT nebo luciferázového genu vede k produkci CAT nebo luciferázové aktivity, které mohou být detekovány standardními CAT testy nebo luminometry. Vektory vhodné pro tento účel jsou dobře známy a jsou snadno dostupné. Tři příklady takových vektorů jsou pKK232–8, pCM7 a pGL3 (Promega, E1751, Genbank č. u47295). Takže promotory pro expresi polynukleotidů podle předkládaného vynálezu zahrnují nejen známé a snadno dostupné promotory, ale také promotory, které mohou být získány výše popsáním způsobem užitím testu s reportérovým genem.

Ke známým bakteriálním promotorům vhodným k expresi polynukleotidů a polypeptidů podle předkládaného vynálezu patří *E. coli* lacI a lacZ promotory, T3 a T7 promotory, T5 tac promotor a promotory lambda PR, PL a trp. Mezi známé eukaryotické promotory vhodné v tomto směru patří CMV bezprostředně časný promotor, promotor thymidinkinázy z HSV, časný a pozdní promotor z SV40, promotory z retrovirových LTR, jako například viru Rousova sarkomu (RSV) a metalothioneinové promotory, jako například myši promotor metalothionein-I.

V hmyzích systémech, virus polyhedrosy jádra (AcNPV) z *Autographa californica* je jeden z několika hmyzích systémů, které mohou být použity jako vektory pro expresi cizorodých genů. Virus se množí v buňkách *Spodoptera frugiperda*. Kódující sekvence diferencně exprimovaného genu může být klonována individuálně do neesenciálních úseků (například gen polyhedrinu) viru a vložen pod kontrolou AcNPV promotor (například promotor polyhedrinu). Úspěšná inserce kódující sekvence diferencně exprimovaného genu povede k inaktivaci polyhedrinového genu a produkci neobaleného rekombinantního viru (tj. viru postrádajícího proteinový obal kódovaný gene pro polyhedrin). Tyto rekombinantní viry jsou pak použity k infekci buněk *Spodoptera frugiperda*, ve kterých je pak vložený gen exprimován. (např. viz Smith et al., 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, U.S. Patent 4,215,051).

V savčích hostitelských buňkách může být použita také celá řada expresních systémů založených na virech. V případech, kdy je užit adenovirus jako expresní vektor, kódující sekvence požadovaného diferencně exprimovaného genu může být ligována k adenovirovému kontrolnímu komplexu transkripce/translace, jako je např. pozdní promotor a tripartitní vedoucí sekvence. Tento chimérický gen pak může být vložen do adenovirového genomu rekombinací *in vitro* nebo *in vivo*. Inserce do neesenciálního úseku virového genomu (např. úsek E1 nebo E3) poskytne rekombinantní virus, který je životaschopný a je schopný exprimovat protein diferencně exprimovaného genu v infikované hostitelské buňce (např., Viz Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655–3659). Specifické iniciační signály mohou být požadovány pro účinnou translaci vložené kódující sekvence diferencně exprimovaného genu. Tyto signály zahrnují ATG iniciační kodon a přilehlé sekvence. V případech, kdy celý diferencně exprimovaný gen, včetně jeho vlastního iniciačního kodonu a přilehlých sekvencí, je vložen do vhodného expresního vektoru, žádný další translační kontrolní signál již není potřeba. Nicméně v případě, kdy je vložena jen část kódující sekvence diferencně exprimovaného genu, exogenní translační kontrolní signál, případně včetně ATG iniciačního kodonu, musí být poskytnout. Kromě toho, iniciační kodon musí být ve fázi s čtecím rámcem požadované kódující sekvence, aby se zajistila translace celého inzertu. Tyto exogenní translační kontrolní signály (Kozackovy sekvence) a iniciační kodony mohou pocházet z různých zdrojů, jak přírodního tak i syntetického původu. Účinnost exprese může být zesílena vložením vhodného enhanceru transkripce, terminátoru transkripce apod. (viz Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516–544).

Selekce vhodných vektorů a promotorů pro expresi v hostitelské buňce je dobře známým postupem a potřebné postupy pro konstrukci expresního vektoru, zavedení vektoru do hostitele a expresi v hostiteli jsou rutinními postupy, které jsou v oboru známy.

Obecně, rekombinantní expresní vektory obsahují počátek replikace, promotor pocházející z genu s vysokou hladinou exprese pro řízení transkripce po směru („downstream“) ležícího strukturálního genu a volitelně selekční marker umožňující po kontaktování buněk a vektoru izolaci buněk, které obsahují vektor.

5

Kromě toho může být vybrán i hostitelský buněčný kmen, který moduluje expresi vložené sekvence nebo modifikuje a zpracovává genový produkt specifickým způsobem. Takové modifikace (např. glykosylace) a opracování (např. štěpení) proteinových produktů mohou být důležitými faktory pro funkce proteinu. Různé hostitelské buňky mají charakteristické a specifický mechanismy pro posttranslační opracování a modifikace proteinů. Vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy mohou být zvoleny, aby se zajistila správná modifikace a opracování exprimovaného cizorodého proteinu. Pro tento účel mohou být použity eukaryotické hostitelské buňky, které mají vlastní buněčný aparát pro správné opracování primárního transkriptu, glykosylaci a fosforylaci genového produktu. Takové savčí hostitelské buňky jsou, ale bez omezení, buňky CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 apod.

15

Pro dlouhodobou produkci rekombinantního proteinu s vysokým výtěžkem je výhodná stabilní exprese. Například může být geneticky zkonstruována buněčná linie, která trvale exprimuje diferencně exprimovaný protein. Spíše než expresními vektory, které obsahují virový počátek replikace, hostitelské buňky mohou být transformovány DNA řízenou vhodnými expresními kontrolními prvky (jako je např. promotor, enhancer, sekvence, transkripce terminátory, polyadenylace místa apod.) a obsahující selekční marker. Po vložení cizí DNA se geneticky upravené buňky ponechají růst po dobu 1 až 2 dní v obohacených médiích a pak jsou přeneseny do selektivního média. Selekční marker v rekombinantním plazmidu poskytne rezistenci k selekci a umožní, aby buňky, které trvale inkorporovaly plazmid do chromozómů, rostly za vzniku „fokusu“, které mohou být klonovány a pak namnoženy do buněčné linie. Tento způsob může výhodně být použit ke genové manipulaci buněčné linie, která exprimuje diferencně exprimovaný protein. Taková geneticky upravená buněčná linie může být konkrétně použitelná pro screening a hodnocení sloučenin, které ovlivňují endogenní aktivitu diferencně exprimovaných proteinů. Takové stabilní buněčné linie mohou být použity přímo jako prostředek buněčné terapie přímo nebo po obalení.

30

Může být použita celá řada selekčních systémů, jako je např. (aniž by výčet byl omezující) thymidin kináza viru herpes simplex (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), hypoxanthin–guanin fosforibosyltransferáza (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), adenin-fosforibosyltransferáza (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817), které mohou být užity v buňkách tk⁻, hgprt⁻ nebo aprt⁻, v daném pořadí. Také rezistence k antimetabolitům může být použita jako základ selekce na dhfr, který udělí rezistenci k methotrexatu (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527), gpt, který udělí rezistenci k mykofenolové kyselině (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072), neo, který udělí rezistenci k aminoglykosidu G-418 (Colberre–Gerapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) a hygromycinu (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147).

35

40

Alternativní systém fúzních proteinů umožňuje rychlou purifikaci nedenaturovaného fúzního proteinu exprimovaného v humánní buněčné linii (Janknecht, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972–8976). V tomto systému je požadovaný gen subklonován do rekombinantního plazmidu vakcínie, takže otevřený čtecí rámec genu je translačně fúzován k aminokoncové „značce“, kterou tvoří šest histidinových zbytků. Extrakty z buněk infikovaných rekombinantním virem vakcínie jsou pak nanášeny na klony s Ni²⁺ nitrilooctovou kyselinou–agarózou a histidinem značené proteiny jsou pak selektivně eluovány imidazol–obsahujícím puforem.

50

Když se použijí jako složky v testovacích systémech, jako například popsáných dále, diferencně exprimovaný protein může být označen, buď přímo nebo nepřímo, pro usnadnění detekce komplexu vytvořeného mezi diferencně exprimovaným proteinem a testovací látkou. Kterýkoliv z celé řady značících systémů může být použit, včetně (bez omezení) radioizotopů, jako je napří-

klad ^{125}I , enzymatických značících systémů, které vytvářejí detekovatelný kolorimetrický signál nebo světlo, když jsou exponovány k substrátu, a fluorescenční značky.

Když je užita technologie rekombinantní DNA k produkci diferenčně exprimovaného proteinu pro takové testovací systémy, může být výhodné zkonstruovat fúzní proteiny, které usnadňují značení, imobilizaci a/nebo detekci.

Nepřímé značení zahrnuje použití proteinu, jako například značené protilátky, který se specificky váže k produktu diferenčně exprimovaného genu. Takové protilátky zahrnují, ale bez omezení, polyklonální, monoklonální, chimérické, jednořetězcové protilátky, Fab fragmenty protilátek a fragmenty vytvořené z Fab expresní knihovny.

V jiném provedení vynálezu nukleové kyseliny obsahující sekvence kódující protein RDCVF1 nebo RDCVF2 nebo jeho funkční derivát jsou podávány, aby podporovaly funkci čípků, a sice metodami genové terapie. Genová terapie se týká terapie prováděné podáváním nukleové kyseliny pacientovi. V tomto provedení vynálezu nukleová kyselina produkuje kódovaný protein, který zprostředkuje terapeutický účinek tím, že podporuje funkce čípků.

Kterákoli z dostupných metod genové terapie může být použita pro realizaci předkládaného vynálezu. Příklady metod jsou popsány dále.

Ve výhodném aspektu léčivý přípravek obsahuje nukleovou kyselinu Rdcvf1 nebo Rdcvf2, který je částí expresního vektoru, který exprimuje protein RDCVF1 nebo RDCVF2 nebo jeho fragment nebo jeho chimérický protein ve vhodném hostiteli. Konkrétně tato nukleová kyselina má promotor operativně spojený s Rdcvf1 nebo Rdcvf2 kódujícím úsekem, přičemž promotor je indukovatelný nebo konstitutivní, a volitelně tkáňově specifický. V dalším konkrétním provedení je použita molekula nukleové kyseliny, kde Rdcvf1 nebo Rdcvf2 kódující sekvence a jakákoliv jiná požadovaná sekvence jsou obklopeny oblastmi, které podporují homologní rekombinaci v požadovaném místě genomu, takže dochází k intrachromozomové expresi nukleové kyseliny Rdcvf1 nebo Rdcvf2 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932–8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435–438).

Podání nukleové kyseliny pacientovi může být buďto přímé, v takovém případě je pacient přímo exponován nukleové kyselině nebo vektoru nesoucímu nukleovou kyselinu, nebo nepřímé, v takovém případě jsou nejdříve buňky transformovány nukleovou kyselinou *in vitro* a pak jsou transplantovány pacientovi. Tyto dva přístupy jsou známy, v daném pořadí, jako *in vivo* nebo *ex vivo* genová terapie.

Ve specifickém provedení nukleová kyselina je přímo podávána *in vivo*, kde je exprimována za vzniku kódovaného produktu. Tento postup může být uskutečněn kteroukoliv z četných metod známých v oboru, např. tak, že se nukleová kyselina vloží jako část vhodného expresního vektoru a podá se tak, že se stane intracelulární složkou, např. infekcí s použitím defektního nebo atenuovaného (oslabeného) retrovirového nebo jiného viru (adenovirus, adeno-asociovaný virus, lentivirus) (viz např. patent USA 4 980 286 a další, citované výše), nebo přímým vstříkem holé DNA nebo použitím ostřelování mikročásticemi (např. genová „puška“, Biolistic, Dupont) nebo potaženou lipidy nebo receptory buněčného povrchu nebo transfekčními činidly, obalenou v liposomech, v mikročásticích nebo mikrotobolkách, nebo navázanou na peptid, o kterém je známo, že vstupuje do jádra, nebo navázanou k ligandu, který pak podléhá receptorem-zprostředkované endocytóze (viz např. patenty USA 5 166 320, 5 728 399, 5 874 297 a 6 030 954, které jsou zahrnuty formou odkazu), kterýžto postup může být použit k cílení na buněčné typy specificky exprimující receptory, apod. V dalším provedení mohou být vytvořeny komplexy nukleová kyselina – ligand, ve kterých ligand obsahuje fusogenní virový peptid pro narušení endosomů, což dovolí nukleové kyselině vyhnout se lysosomální degradaci. V ještě dalším provedení nukleová kyselina může být zaměřena *in vivo* pro buněčně specifický příjem a expresi, cílením na specifický receptor (viz např. PCT Publikace WO 92 06180, WO 92 22635,

WO 92 20316, WO 93 14188 a WO 93 20221). Alternativně nukleová kyselina může být vložena intracelulárně a vnesena do DNA hostitelské buňky pro expresi homologní rekombinací (viz např. patenty US 5 413 923; 5 416 260 ; a 5 574 205; a Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435–438).

- 5 Ve specifickém provedení je použit virový vektor, který obsahuje nukleovou kyselinu Rdcvf1 nebo Rdcvf2. Například může být použit retrovirový vektor (viz např. patenty US 5 219 740, 5 604 090 a 5 834 182). Tyto retrovirové vektory byly modifikovány odstraněním retrovirových sekvencí, které nejsou nutné pro sbalení virového genomu a integraci do DNA hostitelské buňky. Nukleová kyselina Rdcvf1 nebo Rdcvf2 pro použití v genové terapii je klonována do vektoru, který usnadní aplikaci genu do pacienta.

Adenoviry jsou další virové vektory, které mohou být použity v genové terapii. Adenoviry jsou obzvláště atraktivní vehikula pro přenos genů do respiračního epitelu. Adenoviry přirozeně infikují respirační epitel, kde způsobují mírná onemocnění. Dalším cílem pro aplikační systémy založené na adenovirech jsou játra, centrální nervový systém, endotelové buňky a sval. Adenoviry mají výhodu, že jsou schopny infikovat nedělicí se buňky. Metody použití adenovirů v genové terapii jsou popsány např. v patentech USA 5 824 544, 5 868 040, 5 871 722, 5 880 102, 5 882 877, 5 885 808, 5 932 210, 5 981 225, 5 994 106, 5 994 132, 5 994 134, 6 001 557 a 6 033 8843, které jsou zahrnuty formou odkazu.

Adeno–asociované viry (AAV) byly také navrženy pro použití v genové terapii. Adeno–asociované viry jsou obzvláště atraktivní vehikula pro přenos genů do sítnice. Metody využívající AAV jsou popsány např. patentech USA 5 173 414, 5 252 479, 5 552 311, 5 658 785, 5 763 416, 5 773 289, 5 843 742, 5 869 040, 5 942 496 a 5 948 675, které jsou zahrnuty formou odkazu v tomto textu.

Další přístup v genové terapii zahrnuje přenos genu do buněk ve tkáňové kultuře takovými metodami jako je elektroporace, lipofekce, transfekce zprostředkované fosforečnanem vápenatým nebo virovou infekcí. Obvykle způsob přenosu zahrnuje také přenos selekčního markeru do buněk. Buňky jsou pak umístěny pod selekční tlak, aby byly izolovány ty buňky, které přijaly a exprimují přenesený gen. Tyto buňky jsou pak podány pacientovi přímo nebo po obalení.

V tomto provedení je nukleová kyselina vnesena do buňky před podáním *in vivo* výsledné rekombinantní buňky. Toto vnesení může být provedeno jakýmkoliv způsobem známým v oboru, který zahrnuje, avšak bez omezení, transfekci, elektroporaci, mikroinjekci, infekci virovým nebo bakteriofágovým vektorem obsahujícím požadovanou sekvenci nukleové kyseliny, buněčnou fúzi, chromozomem zprostředkovaným přenosem genu, mikrobuňkou zprostředkovaným přenosem genu, fúzí sferoplastů apod. Pro vnášení cizorodých genů do buněk jsou známy četné techniky a mohou být využity při realizaci předkládaného vynálezu, za předpokladu, že nebudou narušeny nutné vývojové a fyziologické funkce příjemce buňky. Použitý postup by měl zajistit stabilní přenos nukleové kyseliny do buňky, aby nukleová kyselina mohla být v buňce exprimována a výhodně dědičná a exprimovatelná i v buněčném potomstvu.

Výsledné rekombinantní buňky mohou být podávány pacientům různými metodami známými v oboru. Ve výhodném provedení epiteliální buňky jsou injektovány, např. subkutánně. V dalším provedení rekombinantní kožní buňky mohou být použity jako kožní štěp (transplantát) u pacienta. Rekombinantní krvinky (např. hematopoetické kmenové buňky nebo progenitorové buňky) jsou výhodně podávány intravenózně. Množství použitých buněk v genové terapii závisí na žádaném efektu, stavu pacienta a dalších faktorech, a může být odborníkem rutinně stanoveno.

Buňky, do kterých se může vnášet molekula nukleové kyseliny pro účely genové terapie, jsou jakékoliv požadované buňky, např. (aniž by výčet byl omezující) epitelové buňky, endotelové buňky, keratinocyty, fibroblasty, svalové buňky, hepatocyty, krevní buňky jako jsou T lymfocyty, B lymfocyty, monocyty, makrofágy, neutrofily, eosinofily, megakaryocyty, granulocyty, růz-

né kmenové a progenitorové buňky, zejména hematopoetické kmenové a progenitorové buňky, které jsou např. získány z kostní dřeně, pupečníkové krve, periferní krve, fetálních jater apod.

5 V provedení, kdy jsou v genové terapii použity rekombinantní buňky, Rdcvf1 nebo Rdcvf2 nukleová kyselina je zavedena do buněk tak, že je exprimována buňkami nebo jejich potomstvem a rekombinantní buňky jsou pak podávány *in vivo* pro dosažení terapeutického účinku. Ve specifickém provedení jsou použity kmenové nebo progenitorové buňky. Kterékoliv kmenové a/nebo progenitorové buňky, které mohou být izolovány a udržovány *in vitro*, mohou být potenciálně použity v souladu s tímto provedením podle předkládaného vynálezu. Takové kmenové buňky 10 zahrnují, ale bez omezení, hemopoetické kmenové buňky (HSC), kmenové buňky epitelových tkání, jako je například kůže a epitel střev, embryonální srdeční svalové buňky, jaterní kmenové buňky (viz např. WO 94 08598) a nervové kmenové buňky (Stemple a Anderson, 1992, Cell 71:973–985).

15 Epitelové kmenové buňky (ESC) nebo keratinocyty mohou být získány z tkání, jako je například kůže a epitel střev, známými postupy (Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229). Ve vrstevnaté epitelové tkáni, jako je například kůže, obnova nastává mitózou kmenových buněk v germinativní vrstvě, vrstva nejbližší lamina basalis. Kmenové buňky ve střevním epitelu zajišťují rychlé tempo obnovy této tkáně. ESC nebo keratinocyty získané z kůže nebo střevního epitelu pacienta 20 nebo dárce mohou být pěstovány ve tkáňové kultuře (Pittelkow a Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771). Jestliže ESC jsou poskytnuty dárce, může také být použit nějaký způsob suprese reakce štěpu proti hostiteli (např. ozáření, podávání léčiv nebo protilátek pro podporu mírné imunosuprese). Kmenové buňky ve střevním epitelu zajišťují rychlé tempo obnovy této tkáně. ESC nebo keratinocyty získané z kůže nebo střevního epitelu pacienta nebo dárce mohou být pěstová- 25 ny ve tkáňové kultuře (Pittelkow a Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771). Jestliže ESC jsou poskytnuty dárce, může také být použit nějaký způsob suprese reakce štěpu proti hostiteli (např. ozáření, podávání léčiv nebo protilátek pro podporu mírné imunosuprese). Kmenové buňky sítnice byly také popsány (Trobepe et al., 2000, Science, 287: 2032).

30 Co se týká hemopoetických kmenových buněk (HSC), kterákoliv technika, která zajistí izolaci, rozmnožování a udržování HSC *in vitro*, může být použita v tomto provedení vynálezu. Techniky, kterými to může být uskutečněno, zahrnují (a) izolaci a založení HSC kultur z buněk kostní dřeně izolovaných z budoucího hostitele nebo dárce nebo (b) použití dříve založených dlouhodobých HSC kultur, které mohou být alogenní nebo xenogenní. Neautologní HSC jsou použity vý- 35 hodně ve spojení se způsobem suprese transplantačních imunitních reakcí budoucího hostitele/pacienta. V konkrétním provedení podle předkládaného vynálezu humánní buňky kostní dřeně mohou být získány z hřebene zadní kosti kyčelní aspirací jehlou (viz např. Kodo et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377–1384). Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu, HSCS mohou být ve vysoce obohacené nebo v podstatě v čisté formě. Toto obohacen může být uskutečněno 40 před dlouhodobou kultivací, během kultivace nebo po ní a může být prováděno kteroukoliv technikou v oboru známou. Dlouhodobé kultivace buněk kostní dřeně mohou být založeny a udržovány například s použitím modifikovaných technik pro tkáňové kultury podle Dextera (Dexter et al., 1977, J. Cell Physiol. 91:335) nebo technikami pro tkáňové kultury podle Witlocka a Witteho (Witlock a Witte, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608–3612).

45 Ve specifickém provedení nukleová kyselina, která má být zavedena pro účely genové terapie, obsahuje indukovatelný promotor operativně spojený s kódujícím úsekem tak, že exprese nukleové kyseliny je kontrolovatelná řízením přítomnosti nebo nepřítomnosti vhodného induktoru transkripce.

50 V tomto textu jsou popsány způsoby produkce protilátek schopných specificky rozpoznávat jeden nebo více diferenčně exprimovaných genových epitopů. Takové protilátky mohou zahrnovat, ale bez omezení, polyklonální protilátky, monoklonální protilátky (mAb), humanizované nebo chimerické protilátky, jednořetězcové protilátky, Fab fragmenty, F(ab')₂ fragmenty, fragmenty vytvářené Fab expresní knihovnou, anti-idiotypové (anti-Id) protilátky a fragmenty vázající epitop 55

- 5 kterékoliv výše uvedené protilátky. Takové protilátky mohou být použity například pro detekci „otisku prstů“, cílového genu v biologickém vzorku nebo alternativně jako způsob inhibice abnormální aktivity cílového genu. Tyto protilátky tedy mohou být použity jako součást léčebných způsobů nemoci a/nebo mohou být použity jako součást diagnostických technik, přičemž pacienti mohou být testováni na abnormální hladiny Rdcvf1 nebo Rdcvf2 nebo na přítomnost abnormálních forem Rdcvf1 nebo Rdcvf2 odběrem vzorků komorové vody a/nebo sklivce metodami známými odborníky v oboru (např. Forster, RK, Abbott, RL, Gelender, H., 1980, Management of infectious endophthalmitis Ophthalmology 87, 313–319)].
- 10 Pro produkci protilátek k diferenčně exprimovanému genu mohou být různá hostitelská zvířata imunizována injekcí diferenčně exprimovaného proteinu nebo jeho částí nebo DNA imunizací. Taková hostitelská zvířata mohou zahrnovat, ale bez omezení, králíky, myši a laboratorní potkany, aby byla jmenována alespoň některá. Pro zesílení imunologické reakce mohou být použita různá adjuvantia, v závislosti na druhu hostitele, zahrnující bez omezení včetně Freundova adjuvans (kompletní a nekompletní), minerální gely, jako je například hydroxid hlinitý, povrchově účinné látky, jako je například lysolecitin, polyoly typu „pluronic“, polyanionty, peptidy, olejové emulze, hemokyanin přílipky, dinitrofenol a potenciálně použitelná humánní adjuvantia, jako je například BCG (bacil Calmette–Guerin) a *Corynebacterium parvum*.
- 15 20 Polyklonální protilátky jsou heterogenní populací protilátkových molekul pocházejících ze séra zvířat imunizovaných antigenem, jako je například produkt cílového genu nebo jeho antigenní funkční derivát. Pro produkci polyklonálních protilátek mohou být hostitelská zvířata, jako jsou například ta popsaná výše, imunizována injekcí diferenčně exprimovaného genového produktu doplněného adjuvancií, jak také bylo popsáno výše.
- 25 30 Monoklonální protilátky, které jsou homogenní populací protilátek ke konkrétnímu antigenu, mohou být získány kteroukoliv technikou, která zajistí produkci protilátkových molekul kontinuální buněčnou linií v kultuře. Ty zahrnují, ale bez omezení, techniku hybridomu podle autorů Kohler a Milstein, (1975, Nature 256:495–497, a patent Spojených Států č. 4 376 110), techniku hybridomu humánních B lymfocytů (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72, Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026–2030) a techniku EBV hybridomu (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., s. 77–96). Takové protilátky mohou být kterékoliv třídy imunoglobulinů včetně IgG, IgM, IgE, IgA, IgD a kterékoliv její podtřídy. Hybridom produkující mAb podle tohoto vynálezu může být kultivován *in vitro* nebo *in vivo*. Produkce vysokých titrů mAb *in vivo* činí z této metody v současnosti výhodný způsob produkce.
- 35 40 Kromě toho mohou být použity techniky vyvinuté pro produkci „chimérických protilátek“ (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851–6855, Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604–608, Takeda et al., 1985, Nature, 314:452–454) sestříhem genů z myši protilátkové molekuly vhodné antigenní specifity společně s geny z humánní protilátkové molekuly vhodné biologické aktivity. Chimérická protilátka je molekula, ve které odlišné části pocházejí z různých živočišných druhů, jako jsou například protilátky, které mají variabilní nebo hypervariabilní úsek pocházející z myši mAb a konstantní úsek z humánního imunoglobulinu.
- 45 50 Alternativně, techniky popsané pro produkci jednořetězcových protilátek (patent Spojených Států 4 946 778, Bird, 1988, Science 242:423–426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879–5883, a Ward et al., 1989, Nature 334:544–546) mohou být přizpůsobeny pro přípravu jednořetězcových protilátek k diferenčně exprimovaným genům. Jednořetězcové protilátky jsou vytvářeny spojením fragmentů těžkého a lehkého řetězce Fv úseku prostřednictvím aminokyselinového můstku, což HAS za následek jednořetězcový polypeptid.
- 55 Nejvýhodněji mohou být techniky použitelné pro produkci „humanizovaných protilátek“ přizpůsobeny tak, aby produkovaly protilátky k polypeptidům, fragmentům, derivátům a funkčním ekvivalentům popsaným v tomto textu. Takové techniky jsou popsány v patentech Spojených

Států 5 932 448, 5 693 762, 5 693 761, 5 585 089, 5 530 101, 5 910 771, 5 569 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 789 650, 5 545 580, 5 661 016 a 5 770 429, popis každého z nich je zahrnut v tomto textu formou odkazu ve své celistvosti.

- 5 Protilátkové fragmenty, které rozpoznávají specifické epitopy, mohou být tvořeny známými technikami. Takové fragmenty například zahrnují, ale bez omezení; $F(ab')_2$ fragmenty, které mohou být tvořeny štěpením pepsinem protilátkové molekula a Fab fragmenty, které mohou být tvořeny redukcí disulfidových můstků $F(ab')_2$ fragmentů. Alternativně, mohou být konstruovány Fab expresní knihovny (Huse et al., 1989, Science, 246:1275–1281), aby se umožnila rychlá a
10 snadná identifikace monoklonálních Fab fragmentů s požadovanou specifitou.

Pro snadnost detekce je obzvláště výhodný test typu sendviče, jehož existuje velké množství variací, předpokládá se, že každá z nich je zahrnována předkládaným vynálezem.

- 15 Například v typickém přímém testu je neznačená protilátka imobilizována na pevném substrátu a testovaný vzorek je přiveden do kontaktu s navázanou molekulou. Po vhodné době inkubace, po časové období dostatečné pro to, aby se umožnila tvorba binárního komplexu protilátka–antigen, v tomto bodě je pak přidána druhá protilátka, značená reportérovou molekulou schopnou indukovat detekovatelný signál, a je inkubována po dobu dostatečnou pro umožnění tvorby trojitěho
20 komplexu protilátka–antigen–značená protilátka. Všechna nezreagovaná látka je vymyta a přítomnost antigenu je určena pozorováním signálu nebo může být kvantifikována srovnáním s kontrolním vzorkem obsahujícím známá množství antigenu. Variace přímého testu zahrnují simultánní test, kdy jsou jak vzorek, tak protilátka přidány současně k vazebné protilátce nebo reverzní test, ve kterém je značená protilátka a testovaný vzorek nejprve spojeny, inkubovány a
25 přidány k neznačené povrchově vázané protilátce. Tyto techniky jsou odborníkům dobře známy a možnost menších variací je snadno patrná. Je zamýšleno, že termín „sendvičový test“, jak se v tomto textu používá, zahrnuje všechny variace základní „dvoumístné“ techniky. Co se týče imunotestů podle předkládaného vynálezu, jediný limitující faktor je, že neznačené a značené protilátky jsou RdCVF1– nebo RdCVF2–specifická protilátka.

- 30 Nejběžněji používané reportérové molekuly v tomto typu testu jsou buď enzymy nebo molekuly obsahující fluorofor či radionuklid. V případě enzymového imunotestu je enzym konjugován ke druhé protilátce, obvykle pomocí glutaraldehydu nebo jodistanu. Nicméně, jak lze snadno připustit, existuje celá řada různých technik ligace, které jsou odborníkovi známy. Běžně používané
35 enzymy zahrnují křenovou peroxidázu, glukózooxidázu, β -galaktosidázu a alkalickou fosfatázu, mimo jiné. Substráty, které se používají se specifickými enzymy, jsou všeobecně vybírány podle tvorby detekovatelných změn barev při hydrolyze odpovídajícím enzymem. Například p-nitro-fenylfosfát je vhodné použít pro konjugáty s alkalickou fosfatázou, pro konjugáty s peroxidázou je obecně používán 1,2-fenylendiamin nebo toluidin. Je také možné používat fluorgenní substrá-
40 ty, které poskytují fluorescenční produkt, spíše než chromogenní substráty uvedené výše. Roztok obsahující vhodný substrát je pak přidán k trojitému komplexu protilátka–RdCVF1– nebo Rd-CVF2–značená protilátka. Substrát reaguje s enzymem spojeným s druhou protilátkou za vzniku kvalitativního vizuálního signálu, který může být dále kvantifikován, obvykle spektrofotometricky, za poskytnutí vyhodnocení množství Rdcvf1 nebo Rdcvf2, které je přítomné ve vzorku séra.

- 45 Alternativně mohou být fluorescenční sloučeniny, jako je například fluorescein a rodamin, chemicky kondenzovány k protilátkám bez změny jejich vazebné kapacity. Když jsou aktivovány ozářením světlem konkrétní vlnové délky, fluorochromem značená protilátka pohlcuje světelnou energii, indukuje stav excitability v molekule, následovaný emisí světla v charakteristické další
50 vlnové délce. Emise se jeví jako charakteristická barva vizuálně detekovatelná světelným mikroskopem. Imunofluorescenční techniky a EIA techniky jsou obě dobře zavedené v oboru a jsou obzvláště výhodné pro předkládaný způsob. Nicméně mohou také být použity další reportérové molekuly, jako jsou například radioizotopy, chemiluminiscenční nebo bioluminiscenční molekuly. Odborníkovi je ihned zjevné, jak lze měnit postup tak, aby byl vhodný pro požadované použití.
55

- Tento vynález se také týká použití polynukleotidů podle předkládaného vynálezu jako diagnostických reagensů. Detekce mutované formy genu kódující polypeptid vybraný ze skupiny, kterou tvoří polypeptidy uvedené v SEKV. ID. Č. 2, SEKV. ID. Č. 4, SEKV. ID. Č. 6, SEKV. ID. Č. 8, SEKV. ID. Č. 10, SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 14, která je spojována s dysfunkcí, bude poskytovat diagnostický nástroj, který se může přidat k diagnostice onemocnění nebo může definovat nemoc nebo vnímavost na onemocnění, které je důsledkem nízké exprese, nadměrné exprese nebo změněné prostorové nebo časové exprese genu. Jednotlivci nesoucí mutace v genu mohou být detekováni na úrovni DNA celou řadou technik.
- 10 Nukleové kyseliny pro diagnostiku mohou být získány z buněk pacienta, jako například z krve, moči, slin, tkáňové biopsie nebo pitevniho materiálu. Genomová DNA může být použita přímo pro detekci nebo může být amplifikována enzymaticky s použitím PCR nebo jiné amplifikační techniky před analýzou. Podobným způsobem mohou také být použity RNA nebo cDNA. Delece a inserce mohou být detekovány změnou velikosti amplifikovaného produktu ve srovnání s normálním genotypem. Bodové mutace mohou být identifikovány hybridizací amplifikované DNA ke značeným nukleotidovým sekvencím. Dokonale komplementární srovnané sekvence mohou být odlišeny od nesouhlasných duplexů štěpením RNázou nebo rozdíly v teplotách tání. Rozdíly DNA sekvence mohou také být detekovány změnami elektroforetické pohyblivosti DNA fragmentů na gelech, buď s denaturačními činidly nebo bez nich (SSCP) nebo přímým sekvencováním DNA (např. Myers et al., Science, 1985, 230:1242). Změny sekvence ve specifické lokalizaci mohou také být odhaleny nukleázovými protekčními testy, jako je například protekce před RNázou a S1, nebo metodou chemického štěpení (viz Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 85: 4397–4401). V dalším provedení může být konstruována matice oligonukleotidových sond obsahující Rdcvf1 nebo Rdcvf2 nukleotidovou sekvenci nebo její fragmenty pro provádění účinného screeningu např. genetických mutací. Technologické metody používající matice jsou známy a mají obecnou použitelnost a mohou být použity pro řešení celé řady otázek molekulární genetiky, včetně genové exprese, genetické vazby a genetické variability (viz například: M. Chee et al., Science, díl 274, s. 610–613, 1996).
- 30 Diagnostické testy nabízejí postup diagnostiky nebo určování vnímavosti na onemocnění prostřednictvím detekce mutace Rdcvf1 nebo Rdcvf2 genu popsány metodami. Kromě toho tyto nemoci mohou být diagnostikovány metodami zahrnujícími zjišťování abnormální exprese Rdcvf1 nebo Rdcvf2 ve vzorku pocházejícím od pacienta: exprese může být měřena na úrovni RNA s použitím kterékoliv metody dobře známé v oboru kvantifikace polynukleotidů, jako je například amplifikace nukleové kyseliny, například PCR, RT-PCR, protekce RNázou, Northern blotování a další hybridizační metody. Techniky testování, které mohou být použity pro určování hladin proteinu, jako je například polypeptid podle předkládaného vynálezu, ve vzorku pocházejícím od hostitele, jsou odborníkům v oboru známy. Takové testovací metody zahrnují radioimunotesty, kompetitivní vazebné testy, analýzu Western blotováním a testy ELISA.
- 40 V dalším aspektu se tedy předkládaný vynález týká diagnostické soupravy, která obsahuje:
- (a) polynukleotid podle předkládaného vynálezu, výhodně nukleotidová sekvence kódující polypeptid vybraný ze skupiny, kterou tvoří polypeptidy uvedené v SEKV. ID. Č. 2, SEKV. ID. Č. 4, SEKV. ID. Č. 6, SEKV. ID. Č. 8, SEKV. ID. Č. 10, SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 14, nebo jeho fragment,
 - (b) nukleotidová sekvence komplementární k sekvenci uvedené v bodě (a),
 - (c) polypeptid podle předkládaného vynálezu, výhodně polypeptid nebo jeho fragment nebo
 - (d) protilátka k polypeptidu podle předkládaného vynálezu, výhodně k polypeptidu vybranému ze skupiny, kterou tvoří polypeptidy uvedené v SEKV. ID. Č. 2, SEKV. ID. Č. 4, SEKV. ID. Č. 6, SEKV. ID. Č. 8, SEKV. ID. Č. 10, SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 14.

Je nutné uznat, že kterákoliv taková souprava, (a), (b), (c) nebo (d) může zahrnovat podstatnou složku. Taková souprava bude použita při diagnostice onemocnění nebo vnímavosti na onemocnění, obzvláště retinitis pigmentosa, makulární degenerace se vztahem k věku, Bardetův–Biedlův

syndrom, Bassenův–Kornzweigův syndrom, Bestova nemoc, choroidom, spirálovitá atrofie, kongenitální amauroza, Refsumův syndrom, Stargardtova nemoc a Usherův syndrom. Nukleotidová sekvence podle předkládaného vynálezu je také cenná pro lokalizaci chromozómu. Chromozómové lokalizace může být dosaženo pomocí PCR na DNA připravené z panelu hybridních buněčných linií (myš–křeček). Chromozómová lokalizace humánního genu může být předpovězena z lokalizace myšního genu na základě syntenie (MacCarthy et al., 1997, *Genome Research*, 7, 1153). Sekvence je specificky cílena do konkrétní lokalizace a může hybridizovat s konkrétní lokalizací na individuálním chromozómu, včetně myšního nebo humánního chromozómu. Zmapování relevantních sekvencí k chromozómům podle předkládaného vynálezu je důležitý první krok pro korelaci těchto sekvencí s nemocemi sdruženými s geny. Jakmile byla jednou sekvence vyznačena do přesné chromozómové lokalizace, fyzická poloha sekvence na chromozómu může být korelována s daty genetických map. Taková data lze nalézt například v práci V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (dostupná on–line prostřednictvím Johns Hopkins University Welch Medical Library, RetNet). Vztah mezi geny a nemocemi, které byly mapovány do stejné chromozómové oblasti je pak identifikován prostřednictvím vazebné analýzy (společná dědičnost fyzicky přilehlých genů).

Mohou také být určeny rozdíly v cDNA nebo genomových sekvencích mezi postiženými a nepostiženými jedinci. Jestliže mutace je pozorována u některých nebo u všech postižených jedinců, ale ne u kterýchkoliv normálních jedinců, pak je mutace pravděpodobně kauzativní agens onemocnění.

Další provedení vynálezu se týká podávání farmaceutického přípravku, ve spojitosti s farmaceuticky přijatelným nosičem, pro kterýkoliv terapeutický účinek pojednaný výše. Takové farmaceutické přípravky se mohou skládat z Rdcvf1 nebo Rdcvf2, mimetik nebo agonistů. Přípravky mohou být podávány samotné nebo v kombinaci s alespoň jedním dalším činidlem, jako je například stabilizátor, který může být podáván ve kterémkoliv sterilním biologicky kompatibilním farmaceutickém nosiči, včetně, ale bez omezení, fyziologického roztoku, pufrovaného fyziologického roztoku, dextrózy a vody. Přípravky mohou být podávány pacientovi samotné nebo v kombinaci s dalšími činidly, léky nebo hormony.

Farmaceutické přípravky zahrnované vynálezem mohou být podávány kteroukoliv cestou: např. aplikací biologicky reaktivního proteinu přes skléru k cévnatce a sítnici (Ambati et al., 2000, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 1186). Formulace topických oftalmických preparátů, včetně očních roztoků, suspenzí a mastí, jsou odborníkům známy (viz Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18. vydání, kapitola 86, stránky 1581–1592, Mack Publishing Company, 1990). K dispozici jsou další způsoby podávání, včetně injekcí do komor (které mohou být prováděny přímo do přední komory nebo přímo do komory sklivce), subkonjunktivální injekce a retrobulbární injekce a jsou také dobře známy metody a prostředky pro výrobu očních preparátů vhodných pro takové způsoby podávání.

Jak se používá v této přihlášce, termín „extraokulární“ se týká očního povrchu a (vnějšího) prostoru mezi oční bulvou a víčkem. Příklady extraokulární úseků zahrnují spojivkovou klenbu nebo spojivkový vak, povrch spojivek a povrch rohovky. Tato lokalizace je externí pro všechny oční tkáně a pro přístup do této oblasti není vyžadován invazivní postup. Příklady extraokulárních systémů zahrnují inzerty a „topicky“ aplikované kapky, gely nebo masti, které mohou být použity pro aplikaci terapeutické látky do těchto úseků. Extraokulární zařízení jsou všeobecně snadno odstranitelná, dokonce i pacientem.

Následující patenty popisují extraokulární systémy, které jsou používány pro aplikaci léků do extraokulárních úseků. Higuchi et al. popisuje v patentech Spojených Států 3 981 303, 3 986 510 a 3 995 635, biologicky rozložitelný oční inzert, který obsahuje lék. Inzert může být vytvořen v různých tvarech pro udržení ve spojivkovém vaku oční bulvy, extraokulárním prostorem mezi oční bulvou a víčkem. Některé běžné biologicky kompatibilní polymery byly popsány jako vhodné pro použití při konstrukci tohoto zařízení. Tyto polymery zahrnují alginát zinečnatý, po-

ly(mléčnou kyselinu), poly(vinylalkohol), poly(anhydridy) a poly(glykolovou kyselinu). Patenty také popisují membránou potažená zařízení se sníženou permeací pro lék a duté komůrky zadržující formulaci léčiva.

- 5 Patent Spojených Států 4 217 898, popisuje mikroporézní zásobníky, které jsou používány pro řízenou aplikaci léčiv. Tato zařízení jsou umístěna extraokulárně ve spojivkovém vaku. Požadované polymerové systémy zahrnují kopolymery poly(vinylchlorid)–ko–poly(vinylacetát). Kaufman popisuje v patentech Spojených Států 4 865 846 a 4 882 150 aplikační systém pro oční léčiva, který zahrnuje alespoň jednu biologicky rozrušitelnou látku nebo nosič mastí pro spojivkový vak. Patent popisuje polymerové systémy, jako je například poly(laktid), poly(glykolid), poly(vinylalkohol) a zesílený kolagen, jako vhodné aplikační systémy.

- 15 V současnosti popsané použití RDCVF1 nebo RDCVF2 proteinového produktu pro léčbu onemocnění nebo poranění sítnice je také výhodné, protože topicky aplikovaná oční formulace zahrnuje agens pro podporu penetrace nebo transportu terapeutického agens do oka. Taková agens jsou v oboru známa. Například autoři Ke et al., patent Spojených Států 5 221 696, popisují použití látek pro zvýšení penetrace očních preparátů přes rohovku.

- 20 Intraokulární systémy jsou ty systémy, které jsou vhodné pro použití v kterémkoliv tkáňovém kompartmentu v tkáňových vrstvách oka samotného, mezi nimi nebo kolem nich. Tyto lokalizace zahrnují subkonjunktivální (pod oční sliznicí přilehlé k oční bulvě), orbitální (za oční bulvou) a intrakomorovou (v komorách samotné oční bulvy). Na rozdíl od extraokulárních systémů je pro přístup do těchto úseků vyžadován invazivní postup skládající se z injekce nebo implantace.

- 25 Následující patenty popisují intraokulární zařízení. Wong, patent Spojených Států 4 853 224, popisuje mikroopouzdrěná léčiva pro zavedení do komory oka. Polymery, které jsou použity v tomto systému, zahrnují polyestery a polyethery. Lee, patent Spojených Států 4 863 457, popisuje biologicky rozložitelné zařízení, které je chirurgicky implantováno intraokulárně pro prodloužené uvolňování terapeutického agens. Zařízení je určeno pro chirurgickou implantaci pod konjunktivu (sliznice oční bulvy). Krezancaki, patent Spojených Států 4 188 373, popisuje farmaceutické vehikulum, které vytváří gel při tělesné teplotě člověka. Toto vehikulum je vodná suspenze léčiva a gum nebo syntetických derivátů na základě celulózy. Haslam et al. Popisuje v patentu Spojených Států 4 474 751 a 4 474 752 systém polymer–léčivo, který je kapalným při teplotě místnosti a vytváří gel při tělesné teplotě. Vhodné polymery použité v tomto systému zahrnují polyoxyethylen a polyoxypropylen. Davis et al. Popisují v patentu Spojených Států 35 5 384 333 biologicky rozložitelný injikovatelný lékový aplikační polymer, který zajišťuje dlouhodobé uvolňování léčiva. Kompozice léku je tvořena farmaceuticky účinnou látkou v biologicky rozložitelné polymerové matici, kde polymerová matrice je pevná při teplotách v rozsahu 20 °C až 37 °C a je tekutá při teplotách v rozsahu 38 °C až 52 °C. Lékový aplikační polymer není omezený na aplikaci rozpustných nebo kapalných formulací léčiva. Například polymer může být použit jako matrice pro stabilizaci a zadržení mikrosfér obsahujících léčivo v místě injekce, lipozomů nebo dalších léčiv navázaných na částice.

- 45 Obzvláště vhodné vehikulum pro intraokulární injekci je sterilní destilovaná voda, ve kterém RDCVF1 nebo RDCVF2 proteinový produkt je formulován jako sterilní, izotonický roztok, vhodně konzervovaný. Ještě další oční přípravek může zahrnovat formulaci RDCVF1 nebo RDCVF2 proteinového produktu s agens, jako jsou například injikovatelné mikrosféry nebo lipozomy, které zajišťují pomalé nebo prodloužené uvolňování proteinu, který pak může být aplikován jako depotní injekce. Další vhodné prostředky pro intraokulární zavedení RDCVF1 nebo RDCVF2 proteinového produktu zahrnují implantovatelná léková aplikační zařízení nebo zařízení, která obsahují RDCVF1 nebo RDCVF2 proteinový produkt.

- 50 Oční preparáty podle předkládaného vynálezu, obzvláště topické preparáty, mohou zahrnovat další složky, například oftalmicky přijatelná konzervační činidla, tonizační činidla, společná rozpouštědla, smáčedla, komplexační činidla, pufrovací činidla, antimikrobiální činidla, antioxidanty a

5 surfaktanty, jak jsou v oboru známy. Například vhodná zesilující tonizační činidla zahrnují halo-
genidy alkalických kovů (výhodně chlorid sodný nebo draselný), mannitol, sorbitol apod. Činidlo
zesilující dostatečně tonicitu je výhodně přidáváno tak, že formulace, která má být instilována do
oka je hypotonická nebo v podstatě izotonická. Vhodná konzervační činidla zahrnují, ale bez
omezení, benzalkoniumchlorid, thimerosal, fenethylalkohol, methylparaben, propylparaben,
chlorhexidin, kyselinu sorbovou apod. Jako konzervační činidlo může také být použit peroxid
vodíku. Vhodná společná rozpouštědla zahrnují, ale bez omezení, glycerin, propylenglykol a
polyethylenglykol. Vhodná komplexační činidla zahrnují kofein, polyvinylpyrrolidon, β -cyklo-
dextrin nebo hydroxypropyl- β -cyklodextrin. Vhodné surfaktanty nebo smáčedla zahrnují, ale
10 bez omezení, estery sorbitanu, polysorbáty, jako je například polysorbát 80, tromethamin, lecitin,
cholesterol, tyloxapol apod. Pufry mohou být běžné pufry, jako je například borát, citrát, fosfát,
hydrouhličitán nebo Tris-HCl.

15 Složky formulací jsou přítomny v koncentracích, které jsou přijatelné pro extraokulární nebo
intraokulární místo podávání. Například pufry jsou použity pro udržování přípravku ve fyziolo-
gickém pH nebo v mírně nižším pH, typicky v rozsahu pH přibližně od 5 do přibližně 8. Další
složky formulací mohou zahrnovat látky, které zajišťují prodloužený pobyt v oku extraokulárně
podávaného terapeutického agens, aby se maximalizoval topický kontakt a podporovala absorp-
ce. Vhodné látky zahrnují polymery nebo látky vytvářející gel, které zajišťují zvýšenou viskozitu
20 očního přípravku. Chitosan je obzvláště vhodná látka jako činidlo řídící rychlost uvolňování
v oku v tekutých formulacích oftalmických léčiv s prodlouženým uvolňováním (viz patent Spo-
jených Států č. 5 442 116, Yen, etl. Al.) Vhodnost formulací podle předkládaného vynálezu pro
řízené uvolňování (např. prodloužené a déle trvající aplikace) očního léčivého agens do oka může
být určována různými postupy v oboru známými, např. jak bylo popsáno v Journal of Controlled
25 Release, 6:367–373, 1987, a také jejich variacemi.

Kromě toho účinných složek tyto farmaceutické přípravky mohou obsahovat vhodné farmaceu-
ticky přijatelné nosiče zahrnující účinných sloučenin do přípravků, které mohou být použity far-
maceuticky. Další detaily o technikách formulace a podávání mohou být zjištěny v posledním
30 vydání Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Farmaceutické přípravky pro perorální podávání mohou být formulovány s použitím farmaceu-
ticky přijatelných nosičů v oboru dobře známých v dávkách vhodných pro perorální podávání.
Takové nosiče umožní to, že farmaceutické přípravky jsou formulovány jako tablety, pilulky,
35 dražé, tobolky, kapaliny, gely, sirupy, kaše, suspenze, apod. pro užívání pacientem.

Farmaceutické přípravky pro perorální použití mohou být získány kombinací účinných sloučenin
s pevným excipientem, volitelně mletím výsledné směsi a zpracováním směsi granulí po přidání
vhodných pomocných látek, je-li žádoucí, za zisku jader tablet nebo dražé. Vhodné excipienty
40 jsou sacharidová nebo proteinová plnidla, jako jsou například cukry, včetně laktózy, sacharózy,
mannitolu nebo sorbitolu, škrob z kukuřice, pšenice, rýže, brambor nebo dalších rostlin, celulóza,
jako je například methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza nebo sodná sůl karboxymethyl-
celulózy, gumy včetně arabské gumy a tragantu, a proteiny, jako je například želatina a kolagen.
Je-li žádoucí, mohou být přidána rozvolňovadla nebo solubilizační činidla, jako je například zesí-
45 těný polyvinylpyrrolidon, agar, alginová kyselina nebo její sůl, jako je například alginát sodný.

Jádra dražé mohou být použita ve spojení s vhodnými obaly, jako jsou například koncentrované
sacharidové roztoky, které mohou také obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidon,
karbopolový gel, polyethylenglykol, a/nebo oxid titaničitý, roztoky laků a vhodná organická roz-
50 pouštědla nebo směsi rozpouštědel. K obalům tablet nebo dražé mohou být přidány pigmenty
nebo barviva pro identifikaci produktu nebo charakterizaci množství účinné sloučeniny, tj. dávky.

Farmaceutické přípravky, které mohou být použity perorálně, zahrnují „push-fit“ tobolky vytvo-
řené ze želatiny, a také měkké uzavřené tobolky vytvořené ze želatiny a povlaku, jako je napří-
55 klad glycerol nebo sorbitol. Push-fit tobolky mohou obsahovat účinné složky smíchané s plnid-

lem nebo pojivy, jako je například laktóza nebo škroby, lubrikanty, jako je například talek nebo stearát hořečnatý, a volitelně, se stabilizátory. V měkkých tobolkách mohou být účinné sloučeniny rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných kapalinách, jako jsou například kapalné mastné oleje, nebo kapalný polyethylenglykol se stabilizátory nebo bez nich.

5

Farmaceutické formulace vhodné pro parenterální podávání mohou být formulovány ve vodných roztocích, výhodně ve fyziologicky kompatibilních pufrch, jako je například Hanksův roztok, Ringerův roztok nebo pufrovaný fyziologický roztok. Vodná injekční suspenze mohou obsahovat látky, které zvyšují viskozitu suspenze, jako je například sodná sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol nebo dextran. Dále mohou být suspenze účinných sloučenin připraveny jako vhodné olejnaté injekční suspenze. Vhodná lipofilní rozpouštědla nebo vehikula zahrnují mastné oleje, jako je například sezamový olej nebo syntetické estery mastných kyselin, jako je například ethylester nebo triglyceridy nebo lipozomy. Pro aplikaci mohou také být použity nelipidové polykationtové aminopolymery. Volitelně, suspenze může také obsahovat vhodné stabilizátory nebo činidla, která zvyšují rozpustnost sloučenin, aby se umožnila příprava vysoce koncentrovaných roztoků.

15

Pro topické nebo nasální podávání jsou ve formulaci použita penetrující činidla vhodná k tomu, aby byla přestoupena konkrétní překážka. Taková penetrující činidla jsou v oboru všeobecně známa.

20

Farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu mohou být vyráběny způsobem, který je v oboru znám, např. pomocí obvyklých postupů míchání, rozpouštění, granulování, tvorby dražé, leštění, emulgaže, opouzdřování, zachytávání nebo lyofilizace.

25

Farmaceutický přípravek může být poskytován jako sůl a může být formulován s mnoha kyselinami, jako je například bez omezení včetně, kyselina chlorovodíková, sírová, octová, mléčná, vinná, jablečná, jantarová, apod. Soli inklinují k tomu, že jsou rozpustnější ve vodných nebo jiných protonových rozpouštědlech než jsou odpovídající formy volných bází. V dalších případech výhodný přípravek může být lyofilizovaný prášek, který může obsahovat kteroukoliv nebo všechny následující látky: 1 až 50mM histidin, 0,1% – 2% sacharóza a 2 až 7% mannitol, v pH roztahu od 4,5 do 5,5, který je smíchan s pufrům před použitím.

30

Poté, co byly farmaceutické přípravky připraveny, mohou být umístěny ve vhodné nádobce a označeny pro léčení indikovaného chorobného stavu. Co se týče podávání Rdcvf1 nebo Rdcvf2, takové označení by zahrnovalo množství, frekvenci a způsob podávání.

35

Farmaceutické přípravky vhodné pro použití v tomto vynálezu zahrnují přípravky, kde účinné složky jsou obsaženy v množství účinném pro dosažení zamýšleného cíle. Stanovení účinné dávky je ve schopnosti daného odborníka.

40

Pro kteroukoliv sloučeninu terapeuticky účinná dávka může být stanovena zpočátku buď v testech na tkáňových kulturách, např. neoplastických buněk, nebo na zvířecích modelech, obvykle myších, králíciích, psech nebo prasatech. Zvířecí model může také být použit pro určování rozsahu vhodných koncentrací a způsobu podávání. Taková informace může pak být použita pro určení dávek a způsobů podávání použitelných u lidí.

45

Terapeuticky účinná dávka se týká takového množství účinné složky, například Rdcvf1 nebo Rdcvf2 nebo jejich fragmentů, protilátek k Rdcvf1, agonistů, které zlepšují symptomy nebo chorobný stav. Terapeutická účinnost a toxicita mohou být určeny standardními farmaceutickými postupy na buněčných kulturách nebo experimentálních zvířatech, např. ED50 (dávka terapeuticky účinná u 50 % populace) a LD50 (dávka smrtelná pro 50 % populace). Poměr dávek mezi toxickými a terapeutickými účinky je terapeutický index a může být vyjádřen jako poměr LD50/ED50. Farmaceutické přípravky, které projevují vysoké terapeutické indexy, jsou preferovány. Data získaná z testů na tkáňových kulturách a ze studií se zvířaty jsou použita při formulaci rozsahu dávek pro humánní použití. Dávka obsažená v takových přípravcích je výhodně v rozsahu

55

hu cirkulujících koncentrací, které mají ED50 s malou nebo žádnou toxicitou. Dávka se mění v tomto rozsahu v závislosti na použité lékové formě, senzitivitě pacienta a způsobu podávání.

5 Přesná dávka bude určena praktickým lékařem ve světle faktorů vztahujících se k pacientovi, který vyžaduje léčbu. Dávka a podávání jsou upraveny tak, aby poskytly dostatečné hladiny účinné skupiny nebo udržely žádaný efekt. Faktory, které mohou brány do úvahy, zahrnují závažnost stavu nemoci, všeobecné zdraví pacienta, věk, hmotnost a pohlaví pacienta, stav výživy, čas a frekvenci podávání, lékovou kombinaci (kombinace), citlivost reakce a toleranci/reakci na terapii. Dlouhodobě působící farmaceutické přípravky mohou být podávány každé 3 až 4 dny, každý 10 týden nebo jednou každé dva týdny v závislosti na poločase a rychlosti clearance konkrétní formulace.

Normální dávkové množství se může měnit od 0,1 až do 100 000 mikrogramů, až do celkové dávky přibližně 1 g v závislosti na způsobu podávání. Směrnice, co se týče konkrétních dávek a 15 způsobů aplikace je poskytnuto v literatuře a všeobecně dostupné odborníkům v oboru. Odborníci budou používat odlišné formulace pro nukleotidy než pro proteiny nebo jejich inhibitory. Podobně, aplikace polynukleotidů nebo polypeptidů bude specifická pro konkrétní buňky, chorobné stavy, lokalizace, apod. Farmaceutické formulace vhodné pro perorální podávání proteinů jsou popsány např. v patentech Spojených Států 5 008 114, 5 505 962, 5 641 515, 5 681 811, 20 5 700 486, 5 766 633, 5 792 451, 5 853 748, 5 972 387, 5 976 569 a 6 051 561.

Následující příklady ilustrují předkládaný vynález, aniž by jakýmkoliv způsobem omezovaly jeho rozsah.

25

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

30

Expresní klonování

Izolace celkové RNA z normální sítnice myší starých pět týdnů

35 Knihovna cDNA byla konstruována ze sítnic myší C57BL/6@N starých pět týdnů obecně podle způsobu autorů Glissin et al., 1974, Biochemistry, 13, 2633–2637. Stručně, po utržení byla zvířata enukleována a oči byly nejdříve umístěny ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty (PBS) doplněném 0,1% diethylpyrokarbonátem (DEPC). Nervová část sítnice byla rychle disekována (retinální pigmentový epitel byl vynecháván v tomto tkáňovém preparátu). Rychle po 40 každé disekci byly tkáně homogenizovány v čerstvém 6M guanidiniumchloridu. Deset sítnic bylo sloučeno do 2,4 ml GC do sterilních zkumavek o objemu 4 ml a tkáň byla porušena kompletně silnou homogenizací po dobu 1 minuty při teplotě místnosti.

Izolace messenger RNA (mRNA) z normální sítnice myší starých pět týdnů.

45

MRNA byla izolována na oligo-dT potažených porézních perličkách (Oligotex, Qiagen) ve stringentních podmínkách podle metody autorů Kuribayashi et al., 1988, Nucleic Acids Res. Symposium series, 19, 61–64. Stručně, 100–150 µg celkové RNA myší sítnice bylo mícháno s 15 µl oligo-dT perliček ve vazebném pufru [10mM Tris pH 7,5, 0,3M NaCl, 0,1M EDTA, 0,5% hmotnost/objem dodecylsulfát sodný (SDS)] a inkubováno 6 minut v 65 °C v kádince o objemu 0,5 l s vodou, pak postupně ochlazeno na teplotu místnosti po dobu asi 3 až 4 hodin, a pak stočeno při teplotě místnosti, a by se znovu získaly agarózové perličky. Byly pak dvakrát promyty inkubací po dobu 10 minut v 0,4 ml pufru (0,1M Tris pH 7,5, 0,1M NaCl, 1mM EDTA, 0,5 % hmotnost/objem SDS). Navázaná RNA (mRNA) byla eluována ve dvou krocích 50 µl vody o teplotě 55 70 °C bez RNázy, precipitována 10 µl acetátu sodného, pH 5,2, a 0,25 ml ethanolu a inkubována

12 hodin v -70°C . mRNA byla sbírána centrifugací (1 hodina v 15 000 rpm, následováno dvěma promytími 70% ethanolem) a resuspendována ve 20 μl vody bez RNázy. mRNA koncentrace byla měřena ve 260 nm a nepřítomnost kontaminace rRNA byla kontrolována gelovou elektroforézou v denaturačních podmínkách, jak uvedeno výše.

5

Syntéza cDNA

Byla prováděna podle metody autorů Okayama a Berg, 1982, Mol Cell Biol., 2, 161–170. Syntéza prvního vlákna byla započata primerem, 2,5 μg NotI adaptérového oligonukleotidu (5'TGTT-ACCAATCTGAAGTGGGAGCGGCCGACAA(T)₁₈ 3') a inkubována po dobu 2 hodin s 50 jednotkami modifikované reverzní transkriptázy viru Moloneyho myší leukémie (M-MLV) (Superscript II, Life Technology) v podmínkách doporučených dodavatelem. Co se týče syntézy druhého vlákna, reakce byla inkubována 4 hodiny ve 14°C se 4 jednotkami RNázyH a 100 jednotkami DNA polymerázy I v SS pufru [40mM Tris pH 7,2, 85mM chlorid draselný, 4,4mM chlorid hořečnatý, 3mM DTT, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovinní sérový albumin (BSA)] v konečném objemu 0,25 ml. Adaptéry EcoRI (5'-OH AATTCGGCACGAGG 3'-OH/3'-OH GCCGTGCTCC5'-PO₄) byly ligovány na oba konce dvojvláknové cDNA během 14 hodin v 16°C s použitím 40 jednotek T4 DNA ligázy (Promega, Madison, USA) v celkovém objemu 20 μl v podmínkách doporučených dodavatelem. Produkty této reakce jsou dscDNA, které mají poloviční místo EcoRI v 5' a NotI poloviční místo ve 3', která mohou být orientována v klonovacím vektoru.

20

Ligace dscDNA do pcDNA3

Byla prováděna podle práce Maniatis T., 1992, Molecular cloning: a laboratory manual, 2. vyd., s použitím 10 μg plazmidu pcDNA3 (Invitrogen) připraveného štěpením s EcoRI a NotI (Promega, Madison, USA) v podmínkách doporučených dodavatelem.

25

Množení rekombinantních klonů

Bylo prováděno obecně podle způsobu autorů Birnboim et al., 1979, Nucleic Acids Res., 7, 1513–1523. Stručně, aby vytvořili pool 100 primárních klonů, původci mírně modifikovalo XL1 Gold (Stratagene) transformační protokol (poskytovaný firmou Stratagene) takto. Po inkubaci v růstovém médiu byla transformační reakce vložena do 20% (objem/objem) glycerolu a 8% (objem/objem) koňského sérového albuminu (HAS, Life Technologies). HAS a glycerol zabránily odumření po zmrazení a rozmrazení. Titrace byla prováděna vynesemím na agarové misky (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin) zvyšováním objemu každé transformační reakce, aby se vypočetl objem poskytující 100 kolonií, zatímco zásoba transformační reakce byla uložena v -80°C . Rekombinantní plazmidy z knihovny byly purifikovány po 96 najednou. Aby bylo připraveno 96 poolů ze 100 klonů, vypočtený objem odpovídající 100 klonům byl nanesen na agar a pěstován 20 hodin ve 37°C . DNA byla purifikována přímo z kolonií snesených z agarových misek. Zásobní roztok každé kultury ve 23% glycerolu byl uložen v -80°C . DNA byla purifikována s použitím Qiawell ultra (Qiagen) s použitím protokolu doporučeného dodavatelem. Typicky, 10 μg purifikovaného plazmidu bylo získáno, koncentrace každého preparátu byla měřena s použitím optické denzity ve 260 nm. Pro další rozdělení vybraných poolů po 100 do poolů po 10, 50 μl ředění 1/250 000 glycerolového zásobního roztoku z původního poolu bylo nanášeno na agarovou misku s koncentrací ampicilinu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po růstu po dobu 16 hodin ve 37°C , jednotlivých 160 kolonií bylo replikováno na 16 agarových miskách (10 na misku) a pěstováno po dobu 16 hodin ve 37°C . 10 kolonií z každé misky bylo získáno a pěstováno v tekutém médiu [Luria Broth (LB), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin] po dobu 3 hodin ve 37°C . Zásobní roztok těchto kultur ve 30% glycerolu byl uložen v -80°C . Plazmidová DNA byla připravena tak, jak je uvedeno výše. Pro další rozdělení podskupin poolů po 10 na individuální klony, 50 μl ředění 1/250 000 glycerolového zásobního roztoku z podskupin poolů po 10 bylo nanášeno na agarovou misku s koncentrací ampicilinu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po růstu po dobu 16 hodin ve 37°C , 16 individuálních kolonií bylo vybráno a pěstováno po dobu 16 hodin ve 2 ml LB s koncentrací ampicilinu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zásobní roztok těchto

50

kultur ve 30% glycerolu byl uložen v -80°C . Plazmidová DNA byla připravena tak, jak je uvedeno výše.

Přechodná (tranzientní) transfekce v buňkách Cos-1

Byla prováděna s použitím metody autorů Chen a Okayama, 1987, High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA (mol Cell Biol., 7, 2745–2752).

Tkáňové kultury sítnice kuřecího embrya

Protokol byl přizpůsoben podle autorů Adler a Hatlee [1989, Science, 243m 391]. Sítnice kuřecího embrya (6 dnů *in ovo*) byla oddělena a nanesena na misky v jednovrstevné kultuře. V těchto kultivačních podmínkách s nepřítomností diferenciačních signálů, čípky představují 60 až 80 % buněk. Původci vytvořili polyklonální protilátky v králíkovi proti visinini (marker kuřecích čípků, Genbank přístupové č. M84729) a ověřili, že podíl čípků kultury byl 60 až 80 %. Jednoduché prostředí modelu původců vynálezu (chemicky definované médium, nepřítomnost buněk buněčných kontaktů) kromě snadnosti a rychlosti metody činí z něj velmi vhodný systém pro studii trofických faktorů zapojených do přežívání čípků. Stručně, sítnice embryí pocházejících z kontrolních izolátů, byly pitvány po šesti dnech vývoje *in ovo*, buňky byly rozděleny a naneseny na misky v nízké denzitě (10^5 buněk/ cm^2). Během deseti dnů byla sledována životaschopnost buněk (60 až 80 % čípků) s použitím testu LIVE/DEAD (Molecular probes, Eugene, USA), testu, který kvantifikuje živé a mrtvé buňky. Počet živých buněk poklesl na 8 % počátečního počtu buněk po sedmi dnech v kultuře v chemicky definovaném médiu. Když byl test prováděn v přítomnosti kondicionovaného média z COS1 buněk transfekovaných pooly klonů z knihovny, živé buňky byly počítány po sedmi dnech *in vitro*.

Kuřecí progenitorové buňky (kmen 657 červené označení) byly udržovány v odděleném kompartmentu pro účel tohoto experimentu v líně 25 km od laboratoře. Oplozená vejce získaná přirozenou cestou byla sbírána týdně a udržována v 17°C (odpovídající biologická nula) v laboratoři po vylíhnutí. Denně bylo inkubováno 5 vajec po dobu 24 hodin ve 20°C , pak 136 hodin ve 37°C s intermitentním obracením sklonu vajec ve zvlhčované komoře. V den kultivace byl povrch vejce omyt Mucocit-A, pak byl rozbit, a kuřecí embrya byla přenesena do PBS. Bylo ověřeno, že fáze vývoje každého embrya odpovídá stupni 29. Vizuálním srovnáním s prací autorů Hamburger a Halmiton, (1951, v Essential Development Biology, Stern and Holland vyd.). Dvě embrya byla vybrána a enukleována, oči byly přeneseny do CO_2 -nezávislého média (Life Technologies). Sítnice byly disekovány a přeneseny do Ringerova pufru a dvakrát promyty. Sítnice byly nařezány na malé kusy a ošetřovány 20 minut ve 37°C roztok trypsinu (0,25 % hmotnost/objem). Reakce byla zastavena přidáním kultivačního média (M199, Life Technologies) doplněného 10% deaktivovaným FCS. Buněčná suspenze byla ošetřena několik minut ve 25 μl DNAázy I v koncentraci 1 mg/ml (Sigma). Buněčná suspenze pak byla dvakrát promyta chemickým definovaným kultivačním médiem [CDCM, stejné objemy médií DMEM a M199 (Life Technologies) a AB s doplňky (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inzulin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin, 64nM progesteron, 0,1mM putrescin, 5ng/ml selene, 3mM taurin, 2,7 μM cytidin 5'-difosfoethanolamin, 5,2 μM cytidin 5'-difosfocholin, 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrokortison, 30nM 3,3'-5-trijodo-L-thyronin, 1mM pyruvát sodný), 0,3 μM prostaglandin D_2 , 0,1 mg/ml linolová kyselina], aby se odstranilo FCS. Koncentrace buněk obarvených trypanovou modří byla měřena pomocí Mallassezovy komůrky a upravena na dvě koncentrace (5,6 a $1,12 \times 10^5$ buněk) odpovídající dvěma hustotám nanášení na misky (2 a 4×10^5 buněk/ cm^2).

Kondicionovaná média z Cos-1 transfekovaných buněk jsou rozmrazena na ledu a 50 μl přeneseno se na dvě 96-jamkové destičky pro tkáňové kultury ošetřené černí (Corning Costar), které byly potaženy roztokem 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-L-lysinu (Sigma) podle schématu:

První kolo screeningu:

1	1	1	1	2	C	2	2	2	3	3	P
C	3	3	4	4	4	C	4	5	5	5	5
6	C	6	6	6	7	7	C	7	7	8	8
8	8	C	9	9	9	9	10	C	10	10	10
11	11	11	C	11	12	12	12	12	C	13	13
13	13	14	14	C	14	14	15	15	15	C	15
16	16	16	16	17	C	17	17	17	18	18	C
18	18	19	19	19	19	P	20	20	20	C	20

- 5 Kde čísla odkazují na počet poolů 100 klonů, C znamená kondicionovaná média z Cos-1 buněk transfekovaných prázdným vektorem (pcDNA3) a P pozitivní kontroly (kondicionovaná média transfekovaná pcDNA-mýšíGDNF).

Druhé a třetí kolo screeningu:

10

x.(y). 01	x.(y). 01	x.(y). 01	x.(y). 01	x.(y). 02	C	x.(y). 02	x.(y). 02	x.(y). 02	x.(y). 03	x.(y). 03	P
C	x.(y). 03	x.(y). 03	x.(y). 04	x.(y). 04	x.(y). 04	C	x.(y). 04	x.(y). 05	x.(y). 05	x.(y). 05	x.(y). 05
x.(y). 06	C	x.(y). 06	x.(y). 06	x.(y). 06	x.(y). 07	x.(y). 07	C	x.(y). 07	x.(y). 07	x.(y). 08	x.(y). 08
x.(y). 08	x.(y). 08	C	x.(y). 09	x.(y). 09	x.(y). 09	x.(y). 09	x.(y). 10	C	x.(y). 10	x.(y). 10	x.(y). 10
x.(y). 11	x.(y). 11	x.(y). 11	C	x.(y). 11	x.(y). 12	x.(y). 12	x.(y). 12	x.(y). 12	C	x.(y). 13	x.(y). 13
x.(y). 13	x.(y). 13	x.(y). 14	x.(y). 14	C	x.(y). 14	x.(y). 14	x.(y). 15	x.(y). 15	x.(y). 15	C	x.(y). 15
x.(y). 16	x.(y). 16	x.(y). 16	x.(y). 16	x.(y).	C	x.(y)	x.(y)	x.(y)	C57	C57	C
C57	C57	C3H	C3H	C3H	C3H	P	0	0	0	C	0

- 15 Kde x (druhé kolo) a y (třetí kolo) představují počet poolů vybraných v prvním a druhém kole, v daném pořadí. 01 až 16 představují použité podskupiny poolů. x(y) reprezentuje parenterální pool, ze kterého pochází 16 poolů. C znamená totéž, co v prvním kole. P byl modifikován jako pCMVScript-CNTF v druhém kole a postupně pcDNA-939.09.08 ve třetím kole. 0 reprezentuje kuřecí buňky čípků pouze v CDCM mediu. C57 a C3H, kondicionovaná média z explantátů sítnic připravená tak, jak bylo popsáno v části týkající se přípravy kondicionovaných médií z explantátů sítnic myši ze sítnic myši C57BL/6@N a C3H/He@N ve věku 5 týdnů, v daném pořadí.

20

50 μ l buněčných suspenzí odpovídajících dvěma hustotám (2 a 4×10^5 buněk/cm²) bylo přidáno do jamek dvou 96jamkových destiček naplněných kondicionovaným médiem 8 kanálovou motorizovanou pipetou (Biohit), aby se minimalizovaly experimentální chyby. Buňky byly inkubovány po dobu 7 dní ve 37 °C v 5% CO₂.

25

Příprava kondicionovaných médií z explantátů sítnic myši

Druhé a třetí kolo screeningu zahrnovalo pozitivní kontroly adaptové dle Mohand-Saïd et al., 1998. Myši kmenů 5C57BL/6@N (divokého typu) a C3H/He@N (*rd1*) ve věku pěti týdnů byly utráceny a enukleovány. Dvě sítnice byly disekovány a inkubovány po dobu 24 hodin ve 37 °C v 5% CO₂ v 1,5 ml CDCM na 12jamkových destičkách. Kondicionovaná média byla získána a 40 krát koncentrována ultrafiltrací na přístroji Vivaspin (Sartorius, hraniční velikost 10 kD). Kondicionovaná média byla zmrazena v kapalném dusíku a skladována v alikvotech v –20 °C před použitím. V den použití byla kondicionovaná média rozmrazena na ledu, naředěna 10 krát CDCM a sterilizována filtrací přes 0,22 µm filtr (Acrodisk 13, Gelman Sciences).

Funkční test, test LIVE/DEAD

Funkční test je založen na počtu buněk kuřecích sítnic životaschopných po 7 dnech inkubace *in vitro*. Původci používali testovací soupravu LIVE/DEAD (Molecular probes, Eugene, USA), která je založena na použití dvou fluorogenních barviv (Calcein AM a dimer ethidia), které barví živé a mrtvé buňky, v daném pořadí. Buňka, která je živá, vyvíjí metabolickou aktivitu (v tomto případě esterázovou aktivitu), která konvertuje substrát (Calcein AM) na jeho fluorescenční produkt emitující v 520 nm. Permeabilita membrány mrtvé buňky je změněna a umožňuje DNA barvení jádra dimerem ethidia emitujícím v 635 nm. Buňka je živá: emituje v 520 nm po excitaci 485 nm nebo mrtvá: emituje v 635 nm po excitaci 520 nm. S použitím epifluorescenční mikroskopie mohou být tyto dva typy fluorescenčních buněk zobrazeny odděleně. Po 7 dnech *in vitro* byly buňky inkubovány po dobu 30 minut při teplotě místnosti ve tmě s 2,7 µM Calcein-AM a 0,3 mM dimerem ethidia.

Získání snímků

Stručně, získání snímků sestávalo z autofokusace každé jamky, automatického počítání buněk ve dvou fluorescencích následovaném zpracováním hrubých údajů s použitím specializovaného software, např. Metamorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA), čímž se získal digitalizovaný obraz každé jamky na destičce. Původci používaly invertovaný mikroskop (Nikon TE 200) vybavený rtuťovou epifluorescenční lampou s dvěma excitačními filtry 485 a 520 nm, dvěma emisními filtry 520 a 635 nm, objektivem (x10) a počítačem řízeným motorizovaným stolem (Multicontrol 2000, Martzauzer a CCD kamera (Cohu).

Pro snímání byla destička umístěna na motorizovaném stolku a zaostření bylo prováděno ručně na první jamce, a tato zaostřovací rovina byla zaznamenána (výchozí). Práh obrazu mrtvého a živého je nastaven z první jamky.

Střed první jamky je nastaven s použitím bílého světla tím, že se ručně nastaví dno jamky na spodek obrazu na počítačovém monitoru, a pak se zarovná pravý kraj první jamky s pravou hranou obrazu na počítačovém na počítačovém monitoru a tyto dvě polohy se zaznamenají. Střed první jamky se pak vypočte a určí polohu střed všech dalších jamek na destičce. Při vývoji metody se původci povšimli, že existuje nepatrně vyšší denzita buněk u okraje jamky a vyřadili proto okraje ze sběru dat. Je důležité, aby obraz každé jamky byl perfektně vycentrován, aby se zabránilo jakýmkoliv klamným výsledkům. Když je vše nastaveno, první skenovací destičky zaznamená mrtvé buňky. Denzita mrtvých buněk je za těchto podmínek méně variabilní. Program provede automatické zaostřování tím, že sejmou obrazy v různých ohniskových rovinách a vybere ten nejjasnější, pak koriguje zaostření. Tato poloha je pak uchována uložena a motorizovaný stolek koná naprogramované pohyby ve směru os x a y a sejmou celkem 4 obrazy, které po reorganizaci do jednoho obrazu reprezentují 2/3 povrchu jamky. Řada obrazů z ohniskových rovin je uchována pro kontrolu. Stolek vykoná automatické zaostřování a provede čtyři snímky pro každou jamku destičky počínaje jamkami A1 až A12, pak B12 až B1, C1 až C12 atd. Na konci se stolek posune mimo destičku, aby se přeexponoval poslední jamka (H1). Skenování mrtvých buněk trvá 30 minut. Druhé skenování (živé buňky) se provede po výměně filtru. Toto druhé skenování se

provádí s použitím zaznamenané polohy každé jamky z předchozího skenování mrtvých buněk. Pro každou jamku jsou provedeny čtyři snímky stejně jako pro mrtvé buňky. Na konci druhého skenování (22 minut) reorganizované obrazy mrtvých a živých buněk jsou uloženy do datového souboru, který je automaticky označen datem dne. Počty buněk (mrtvých a živých) jsou počítány automaticky s předem nastavenými morfometrickými parametry (průměrnými) a jsou ukazovány na počítači, aby bylo možné kontrolovat, zda experiment probíhá správně. Je důležité kontrolovat denně, zda počet živých buněk není příliš vysoký. Původci zjistili, že jestliže se nanese příliš vysoká denzita buněk, buňky kuřecí sítnice přežívají déle pravděpodobně proto, že produkují vlastní přeživací faktor. Buňky byly proto skenovány v nepřítomnosti tohoto účinku. Před skenováním druhé destičky (stejný experimentovat, ale s dvakrát vyšší hustotou nanesených buněk) bylo přidáno „a“ na konec jména uloženého souboru pro první destičku. Snímky z každého experimentu pak byly uloženy na CD-ROM. Byla tak vytvořena knihovna s více než 250 CD-ROM.

Počítání buněk a poolů

Počty buněk (živé a mrtvé) byly určeny ze snímků archivovaných pro každý experiment na CD-ROM. Sběrný datový soubor z experimentu byl nejdříve uložen do počítače (počítání off-line) a otevřel s použitím softwaru Metamorph. V prvním kroku se otevřely obrazy odpovídající 14 jamkám C (kondicionovaná média z Cos-1 buněk transfekovaných prázdným vektorem). Poté, co byl nastaven práh obrazu, příkaz Integrated Morphometry Analysis byl použit ke zjištění distribuce oblastí mezi 10 a 250 objekty (počet živých buněk pro každou celkovou oblast) pro tyto kontrolní jamky. Distribuce sledovala Gaussovu křivku s maximálním počtem objektů odpovídajících izolované buňce. Tato standardní hodnota (SV) pak byla použita k výpočtu hodnot pro oblasti vyšší, kde objekt je počítán jako dvě buňky (standardní řez objektu, SOC) na základě vlastní empirické funkce: $SOC = 29/20,74/SV$. Hodnota SOC každé individuální destičky je pak určena k výpočtu množství živých buněk na destičce. Tyto hodnoty se pak přenesou do tabulky v programu Excel.

V prvním kole screeningu byly hodnoty získané pro každý pool vyneseny jako násobky (zvýšení nebo snížení počtu živých buněk) proti průměru ze 14 kontrolních jamek + směrodatná odchylka. Aby se potlačila variabilita způsobená rozdílnou polohou na destičce, byl vypočten průměr rozdílu individuálně mezi 80 jamkami odpovídajícími polohám, kde jsou testované pooly, a 14 kontrolním jamkám pro 200 nezávislých destiček. V průměru byly pozorované rozdíly jen důsledek rozdílné polohy a počty buněk pak byly korigovány takto získaným koeficientem. Pro přísnější diskriminaci při výběru poolů byly počty živých buněk vyneseny do grafu jako násobky rozdílu proti kontrole a všechny hodnoty byly menší než 1,3 ale větší než 0,4. Tímto způsobem bylo určeno, že všechny pooly s násobkem rozdílu proti průměru 14 jamek odpovídajících prázdnému vektoru ležící v intervalu od 0,4 do 1,3 byly považovány za neúčinné a byly použity jako kontrola. Po korekci násobek rozdílu proti kontrolním dvěma destičkám vynásoben a výsledek byl roztržěn podle klesajícího násobku. Pooly na vrcholu tohoto seznamu byly dále vizuálně kontrolovány prohlídkou grafu odpovídajícího 20 poolům z experimentu (obě destičky) a snímků živých a mrtvých buněk, aby se zabránilo screeningu klamných poolů.

Pro druhé a třetí kolo screening destiček na podskupiny poolů zahrnoval další kontroly. Původci připravili kondicionovaná média z retinálních explantátů myší ve věku 5 týdnů. Původci vybrali experimenty, kde byly zaznamenány pozitivní účinky na explantáty sítnic myší C57BL/6@N, a vyloučili ostatní. Výsledky byly vyneseny do grafu jako násobek rozdílu proti 14 kontrolním jamkám, nebylo prováděno žádné přepočítávání kontrol. Násobek rozdílu proti kontrolám ze dvou destiček byl vynásoben a výsledky byly tříděny podle poklesu násobku rozdílu pro 16 podskupin poolů.

Izolovaná cDNA byla sekvencována s použitím T7 primeru (5' GTAATACGACTCACTATA-GGGC 3') na kapilárním sekvenátoru (CEQ2000, Beckman Coulter). DNA sekvence byly srovnány s databázemi s použitím programu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Identifikace *Rdcvf2* a humánních homologů

S použitím *Rdcvf1* sekvence (nukleotidová sekvence kódující polypeptidy uvedené v SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 4) a programu BLAST byly identifikovány homologní myší a humánní polypeptidy (obrázek 8). Byly identifikovány EST klony s homologií k myší *RdCVF2* (GenBank přístupové č. Bc016199): GenBank přístupové č.: be552141, bi517442, bg707818, bi603812, ai433287, be088414, bg297383, bg297304 (viz také obrázek 12). Byly identifikovány EST klony s homologií k myší *Rdcvf1* (SEKV. ID. Č. 1): GenBank přístupové č. Bg299078, ai716631, bg294111, be108041, bg395178 (viz také obrázek 13).

RT-PCR analýza *Rdcvf1* exprese v reálném čase

Retinální exprese *Rdcvf1* kmeny myší C57BL/6@N a C3H/He@N, také ve věku stejném jako kongenní C3H (+/+ a rd/rd) 5 týdnů, byla studována s použitím RT-PCR v reálném čase na cyk-
 15 leru (Roche) PCR soupravou s barvivem sybergreen (Roche). cDNA jsou tvořeny s použitím primeru, a to náhodným hexamerním oligonukleotidem (pdN6, Amersham), M-MLV reverzní transkriptázou (Superscript II, Life Technologies) a celkové RNA z myší sítnice připravené jako
 20 v bodě 1). cDNA jsou standardizovány s použitím všudypřítomné messenger RNA glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH). Syntéza 0,2 µl prvního vlákna cDNA (ekvivalent 10 ng celkové RNA) je amplifikována 2 µM oligonukleotidy SEKV. ID. Č. 24 a SEKV. ID. Č. 25 v trojím opa-
 25 kování v celkovém objemu 25 µl s použitím následujícího programu: 30 sekund v 95 °C a 35 cyklů sledu (1 sekunda v 95 °C, 18 sekund v 55 °C, 10 sekund v 72 °C). Analýza (obrázek 16) ukazuje, že exprese *Rdcvf1* se snižuje po degeneraci tyčinek u *rd1* myší (C3H/He@N). Bylo také ukázáno pomocí RT-PCR v reálném čase s použitím RNA připravené z vnější vrstvy sítnice z řezů na vibratomu, že *Rdcvf1* je přímo exprimován fotoreceptory.

Produkty byly kontrolovány elektroforézou na agarózovém gelu. Podobné výsledky byly získány s dalším párem *Rdcvf1* specifických primerů. Jako pozitivní kontrola byla monitorována exprese
 30 arrestinu tyčinek (klon č. M24086) ve stejných podmínkách s primery (5' CTATTACGTCAAG-CCTGTAGCC 3' a 5' CATCCTCATCTTTCTTCCCTTC 3'). Potvrzení, že *Rdcvf1* je protektivní faktor čípků může být získáno přidáním vhodného množství *Rdcvf1* k retinálnímu explantátu z 5 týdnů staré *rd1* myší (C3H/He@N). Ke vhodnému množství lze dospět některými výchozími titračními experimenty. Ve srovnání s vhodnými kontrolami po 7 dnech je přežívání čípků zvýše-
 35 no.

RT-PCR analýza *Rdcvf2*

RT-PCR pro expresi *Rdcvf2* bylo prováděno s použitím primerů:

5' -GCCAGCGTTTTCTGCCTTTTAC-3' a

40 5' -AAGCCCTGCCTGCTCTAACATC-3'.

Analýza ukazuje, že *RdCVF2* je exprimován způsobem závislým na tyčinkách a že *Rdcvf2* ex-
 45 prese není restringována na sítnici, ale že také další neuronové buňky exprimují *Rdcvf2* (obrázek 17), zatímco exprese *Rdcvf1* se jeví být restringována na buňky sítnice.

Testy LIVE/DEAD Rdcvf1 nebo Rdcvf2

Buňky COS–1 jsou transfekovány vhodným expresním vektorem nesoucím Rdcvf1 nebo Rdcvf2 pod kontrolou indukovatelného promotoru. Kontrolní buňky jsou transfekovány prázdným vektorem. Buňky jsou inkubovány po vhodné časové období po indukci Rdcvf1 nebo Rdcvf2 exprese. Následně, počet přežívajících buněk čípků inkubovaných s kondicionovaným médiem z COS–1 buněk transfekovaných Rdcvf1 nebo Rdcvf2 a počet přežívajících kontrolních buněk je počítán podle výše popsaného způsobu. Buňky exprimující Rdcvf1 nebo Rdcvf2 ukazují významně vyšší množství přežívajících buněk.

Faktor specifický pro tyčinky

Analýza RT–PCR v reálném čase, prováděná ve standardních podmínkách, exprese arrestinu tyčinek (kontrola) a Rdcvf1 na 5 týdnů starých retinálních explantátech myši C57BL/6@N ve věku 5 týdnů a C3H/HE@N, s použitím primerů:

SEKV. ID. Č.: 24: 5' TCTATGTGTCCCAGGACCCTACAG 3'

SEKV. ID. Č.: 25: 5 TTTATGCACAAGTAGTACCAGGACAG 3'

Analýza prokázala, že RdCVF1 je exprimován pouze v přítomnosti tyčinek (tyčinkovýCVF1).

Produkce polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky byly připraveny injekcí purifikovaného fúzního proteinu s glutathion–S–transferázou (GST) (GST–Rdcvf1), a také aminokyselin z myši RdCVF1 peptidové sekvence 11 až 32 ze SEKV ID Č. 2 (Ab č. 2) a aminokyselin peptidové sekvence 79 až 96 ze SEKV ID Č. 2 (Ab č. 3) do králíka. Fúzní konstrukt pGST–Rdcvf1 byl připraven amplifikací s oligonukleotidy SEKV. ID. Č. 26 a SEKV. ID. Č. 27 s použitím pcDNA–Rdcvf1 jako templátu ve standardních podmínkách. Otevřený čtecí rámec (ORF) Rdcvf1 byl klonován ve shodném čtecím rámci do pGex2TK (Pharmacia) mezi BamHI a EcoRI restriční místa a transformován do E. coli (BL21 (DE3) pLysS, Promega] standardním postupem. Jedna kolonie byla pěstována ve 3 litrech LB tekutého média s ampicilinem v koncentraci 100 µg/ml ve 30 °C a produkce proteinu byla indukována přidáním isopropylthio–β–D–galaktosidu (IPTG) v koncentraci 1 µg/ml a pokračovala po dobu 5 hodin ve 30 °C. Buňky byly sklizeny, lyzovány sonikací a purifikovány na glutathion–sefaraže podle standardního protokolu. Fúzní protein byl eluován 10mM redukovaným glutathionem při teplotě místnosti. Eluovaný protein byl dialyzován do PBS před injekcí králíkům. Čistota proteinu byla monitorována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Dva králíci byli imunizováni intradermální injekcí v 80 místech 100 µg purifikovaného GST–Rdcvf1. Sérum bylo sklízeno po 8 týdnech.

SEZNAM SEKEVNÍ

<210> 1
 <211> 468
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (45) .. (374)
 <223>

<400> 1
 atcggatccc tctctgggtc cccagctcct tgcatactgc tacc atg gca tct ctc 56
 Met Ala Ser Leu
 1

ttc tct gga cgc atc ttg atc agg aac aac agc gac cag gat gaa gtg 104
 Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu Val
 5 10 15 20

gag aca gag gca gag ctg agc cgt agg tta gag aat cgt ctg gtg ttg 152
 Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val Leu
 25 30 35

ctg ttc ttc ggc gcc ggc gcc tgt ccc cag tgc cag gcc ttt gcc cca 200
 Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Ala Pro
 40 45 50

gtc ctc aaa gac ttc ttc gtg cgg ctc act gac gag ttc tac gtg ctg 248
 Val Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val Leu
 55 60 65

cgg gca gca cag ctg gcc ctg gtc tat gtg tcc cag gac cct aca gag 296
 Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Pro Thr Glu

70 75 80

gag caa cag gac ctc ttc ctc agg gac atg cct gaa aaa tgg ctc ttc 344
 Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu Lys Trp Leu Phe
 85 90 95 100

ctg ccg ttc cat gat gaa ctg agg agg tga ggccccaggg aagaccaggg 394
 Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg
 105

agggcttcct ggagaaggca tticcctgga ggtttactgt cctggtacta cttgtgcata 454
 aagaggtatt cctc 468

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Gln Asp Glu Val Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45

Ala Phe Ala Pro Val Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
 50 55 60

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80

Asp Pro Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu
 85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg
 100 105

<210> 3

<211> 764

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(676)

<223>

[illegible]

aggttgatga ccctcccgaa ggaaccgg

764

<210> 4

<211> 216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
1 5 10 15Gln Asp Glu Val Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn
20 25 30Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
35 40 45Ala Phe Ala Pro Val Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
50 55 60Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
65 70 75 80Asp Pro Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu
85 90 95Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg Asp Leu Gly
100 105 110Arg Gln Phe Ser Val Arg Gln Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro
115 120 125Gly Gly Asp Val Leu Thr Ser Asp Ala Thr Glu Glu Ile Gln Arg Leu
130 135 140Gly Pro Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Leu Leu Asp
145 150 155 160Arg Ser Phe Leu Gln Pro Glu Asp Leu Asp Glu Pro Ala Arg Arg Ser
165 170 175Ile Thr Glu Pro Leu Arg Arg Arg Lys Tyr Arg Val Asp Arg Asp Val
180 185 190Gly Gly Ser Gly Ala Lys Arg Arg Asp Ser Gly Glu Pro Gln Gly Asp
195 200 205

Ala Gly Thr Arg Ala Glu Leu Trp
210 215

<210> 5

<211> 353

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(353)

<223>

<400> 5
cccagcaccc aacccagggtt acc atg gcc tcc ctg ttc tct ggc cgc atc ctg 53
Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu
1 5 10

atc cgc aac aat agc gac cag gac gag ctg gat acg gag gct gag gtc 101
Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val
15 20 25

agt cgc agg ctg gag aac cgg ctg gtg ctg ctg ttc ttt ggt gct ggg 149
Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly
30 35 40

gct tgt cca cag tgc cag gcc ttc gtg ccc atc ctc aag gac ttc ttc 197
Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe
45 50 55

gtg cgg ctc aca gat gag ttc tat gta ctg cgg gcg gct cag ctg gcc 245
Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala
60 65 70

ctg gtg tac gtg tcc cag gac tcc acg gag gag cag cag gac ctg ttc 293
Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe
75 80 85 90

ctc aag gac atg cca aag aaa tgg ctt ttc ctg ccc ttt gag gat gat 341
Leu Lys Asp Met Pro Lys Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp
95 100 105

ctg agg agg tga 353
Leu Arg Arg

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45

Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
 50 55 60

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
 85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg
 100 105

<210> 7

<211> 686

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(686)

<223>

[illegible]

<210> 8
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
 1 5 10 15
 Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30
 Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45
 Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
 50 55 60
 Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80
 Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
 85 90 95
 Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp Leu Gly
 100 105 110
 Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro
 115 120 125
 Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln Arg Leu
 130 135 140
 Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val Leu Asp
 145 150 155 160
 Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser
 165 170 175
 Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala
 180 185 190
 Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala
 195 200 205
 Gly Gly Leu Phe
 210

<210>	9
<211>	600
<212>	DNA
<213>	Mus musculus

```
<220>
<221> CDS
<222> (265)..(570)
<223>
```

[illegible]

<210> 10

<211> 101

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30

Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45

Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80

Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95

Asp Pro Tyr Arg Gln
 100

<210> 11

<211> 1164

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (300)..(770)

<223>

<400> 11
 ttgactctgg tgggtagaga gggtttgcaa ggcaggataa aatagagggt gggagagggt 60
 gatggcgtgg ctctgctttt tgggtgcgggg caccagctgt catcgctgct gtcgcagctt 120
 ctggagtggc cactgtgctc tctcctccct tcggctcaag gtgagctgtt ccagcagaag 180
 gcggggctga gaggcgccta gtgctgcggg aggcctcagtg tcattctcca gctaacagggt 240
 ggccgtgcag cccagggtctc gtctctccac tgtgtctctt tcacgccgag ctcgtggcg 299
 atg gtg gac gtg ctg ggc ggg cgg cgc ctg gtg acc cgg gag ggc acg 347
 Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
 1 5 10 15
 gtg gtg gag gcc gag gtg gcg ctg cag aac aag gtg gta gct ttg tac 395
 Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30
 ttt gcg gcg ggc cgg tgc tgc ccc agc cgc gac ttc acg ccg ctg ctc 443
 Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45
 tgc gac ttc tac acg gag ctg gtg agc gag gcg cgg cgg ccc gct ccc 491
 Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60
 ttc gag gtg gtt ttc gtg tgc gca gac ggc agt gcg gag gag atg ttg 539
 Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80
 gac ttc atg cgc gag ctg cac ggc tcc tgg ctg gca ttg ccc ttc cac 587
 Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95
 gac ccc tac cgg cat gaa ctg aag aag agg tac gaa atc acc gcc atc 635
 Asp Pro Tyr Arg His Glu Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile
 100 105 110
 ccc aag ctg gtg gtc atc aag cag aac gga gct gtc atc acc aac aaa 683
 Pro Lys Leu Val Val Ile Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys
 115 120 125
 ggg cgg aag cag atc cga gag cgc ggg cta gct tgc ttt cag aac tgg 731
 Gly Arg Lys Gln Ile Arg Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp
 130 135 140
 gtg gaa gca gcc gat gtt ttc caa aac ttc tgc ggg tga ccagggcagt 780
 Val Glu Ala Ala Asp Val Phe Gln Asn Phe Ser Gly
 145 150 155

tgctggaagt tcagggcaac tatcttcaaa aagggttag ctggttcct tctctgctga 840
 ggaatgtcat ttagagtgca ccatgctgtg acagagagca taaactgtc aggaaagaac 900
 tacgtctgcc ccctgtgggt cctagagctc cgttgaatgt ttatttctta cacctttctc 960
 caccggtgcc taggatccag gacacatcag ccacgagtta acagaactct atgcaagatg 1020
 ctctttccta caggaaattt ctttgataaa ttgacctatg gaggtgatac attttctgat 1080
 gacatttttg tgatgctttg gtaaactgtat ttattactcg ggtttgtaga ctgtgtaatt 1140
 taataaacca aactcacac ttg 1164

<210> 12

<211> 156

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
 1 5 10 15
 Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30
 Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45
 Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60
 Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95
 Asp Pro Tyr Arg His Glu Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile
 100 105 110
 Pro Lys Leu Val Val Ile Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys
 115 120 125
 Gly Arg Lys Gln Ile Arg Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp
 130 135 140
 Val Glu Ala Ala Asp Val Phe Gln Asn Phe Ser Gly
 145 150 155

<210> 13
 <211> 1472
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (331)..(738)
 <223>

<400> 13
 gtgtgggcgg ggcgcagttg ggggaggggtg cagagacctg agggcttgag gttgcctggc 60
 tggccccgct cccagaggcg ggtgccgcgc tgcgcccag gtatctgggg tctctggtgt 120
 ctgagtgtct cattgtcggc gcgaacacaa ttgctccagc cacaggcgag gcctggccaa 180
 ggtgtgggcg catctagggc aggtccttgag aggtccagcg cccggtggtg cggacagagg 240
 cggggcaccg cggcgctcgc cgccgcctcc ccgcaggtga tcctctcct gcaggtgtcc 300
 tcgggtctca ggtggctgcg tgtctgcgcc atg gtt gac att ctg ggc gag cgg 354
 Met Val Asp Ile Leu Gly Glu Arg
 1 5

cac ctg gtg acc tgt aag ggc gcg acg gtg gag gcc gag gcg gcg ctg 402
 His Leu Val Thr Cys Lys Gly Ala Thr Val Glu Ala Glu Ala Ala Leu
 10 15 20

cag aac aag gtg gtg gca ctg tac ttc gcg gcg gcc cgg tgc gcg ccg 450
 Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr Phe Ala Ala Ala Arg Cys Ala Pro
 25 30 35 40

agc cgc gac ttc acg ccg ctg ctc tgc gac ttc tat acg gcg ctg gtg 498
 Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu Cys Asp Phe Tyr Thr Ala Leu Val
 45 50 55

gcc gag gcg cgg cgg ccc gcg ccc ttc gaa gtg gtc ttc gtg tca gcc 546
 Ala Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala
 60 65 70

gac ggc agc tgc cag gag atg ctg gac ttc atg cgc gag ctg cat ggc 594
 Asp Gly Ser Cys Gln Glu Met Leu Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly
 75 80 85

gcc tgg ctg gcg ctg ccc ttc cac gac ccc tac cgg caa cgg agt ctc 642
 Ala Trp Leu Ala Leu Pro Phe His Asp Pro Tyr Arg Gln Arg Ser Leu
 90 95 100

gct ctg ttg ccc agg ctg gag tgc agt ggc gtg atc tta gct cac tgc 690
 Ala Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys Ser Gly Val Ile Leu Ala His Cys
 105 110 115 120

aac ctt tgc ctc ctg ggt tca agt gat tct cta gcc tta gcc tcc tga 738
 Asn Leu Cys Leu Leu Gly Ser Ser Asp Ser Leu Ala Leu Ala Ser
 125 130 135

```

gcatctggga ctacagccat tgctgtgaat tacgtgaggg aaagatattg aagaggagtt 798
ggacactccg agagtgcagc tgttctcccc ccgcaccatc cgtgtcctgc attctgagag 858
tctgtgctca ttaacaatgt gctgtgacca tgtgactcag caatcctgct gctgggtata 918
tacccgaaag aaaggaaaag gaagccagta tattgaagag gtatctgcac ccccatgttt 978
attgcagcac tgttcacaac agccaagatt tggaagcaac ctaagtgtcc atcaacagat 1038
gaatggataa agaaaacgtg gtacatatac acaatggagt actcttcagc cattaataaa 1098
atgagattct gtcatttgca ataatataga tggaaaagga ggcccttatg tgaagtgaag 1158
taagccaggc acagaaagac aaacatcaca tgttctcact tatttggtgg atctaattgat 1218
caaaacaatt gaactcttg acatagagag tagaagggtg gttaccagaa gctggaaagg 1278
aaagtggggg tgggaggaag gtgggaatgg ttaataggta caaaaaata caaagaataa 1338
ataagacctt atatttgata gcacaacagt gtgactactg tcaataatca ttaattgta 1398
catttaaaaa taactataat tgcattgttt gtaacacaaa agataaatgc ttgaggagaa 1458
aaaaaaaaaa aaaa 1472

```

<210> 14

<211> 135

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Val Asp Ile Leu Gly Glu Arg His Leu Val Thr Cys Lys Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Glu Ala Glu Ala Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
20 25 30

Phe Ala Ala Ala Arg Cys Ala Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
35 40 45

Cys Asp Phe Tyr Thr Ala Leu Val Ala Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
50 55 60

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Cys Gln Glu Met Leu
65 70 75 80

Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ala Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
85 90 95

Asp Pro Tyr Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys
100 105 110

Ser Gly Val Ile Leu Ala His Cys Asn Leu Cys Leu Leu Gly Ser Ser
115 120 125

Asp Ser Leu Ala Leu Ala Ser
130 135

<210> 15

<211> 702

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15
atcggatcct ctctgggtcc ccagctcctt gcatactgct accatggcat ctctcttctc 60
tggacgcatac ttgatcagga acaacagcga ccaggatgaa gtggagacag aggcagagct 120
gagccgtagg ttagagaatc gtctggtgtt gctgttcttc ggcgccggcg cctgtcccca 180
gtgccaggcc ttgccccagt cctcaaagac ttcttcgtgc ggctcactga cgagttctac 240
gtgctgcggg cagcacagct ggccctggtc tatgtgtccc aggaccctac agaggagcaa 300
caggacctct tcctcagggg catgcctgaa aaatggctct tcctgccgtc cactgatga 360
actgaggagg tgaggcccca gggaagacca gggagggctt cctggagaag gcatttcctt 420
ggagggtttac tgtcctggta ctacttgtgc actaaagagg tattcttcca caccaaccac 480
aggcgacaac aacacacaag aggtgtccca tccgtctctc catcacagcc cactgacgcc 540
agacagcatc gcgacgtca cggtcagaa aaacacaggt agtctcacag gcctgccatc 600
ctaatactgg ccaccctgag cacaagagcg atggctacaa gcctcaaggc tagaatctaa 660
aaccacgagg tggggaccgt agggccact ccccgaggc gc 702

<210> 16

<211> 387

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

```

cggccgctta attaagacgg atccccgact acgtagtcgg gaattcggca cgaggggccc 60
catcttgatc aggaacaaca gcgaccagga tgaagtggag acagaggcag agctgagccg 120
ccggtttagag aatcgtcttg tgctactggt cticgggtgct ggggcctgtc cccagtgcc 180
ggccttcgcc ccagtcctca aagacttctt cgtgcggctc actgatgagt tctacgtgct 240
acgggcagca cagctggccc tggcttatgt gtcccaggac cctacagagg agcaacagga 300
cctgttcctc cgggacatgc ctgaaaagtg gctcttcctg ccgttccatg atgacctgag 360
gagagacctc gggcgccagt tctccgt 387

```

<210> 17

<211> 759

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

```

cagctccttg catactgcta ccatggcatc tctcttctct ggacgcatct tgatcaggaa 60
caacagcgac caggatgaag tggagacaga ggcagagctg agccgtaggt tagagaatcg 120
tctggtgtgc tgttcttcgg cgccggcgcc tgtccccagt gccaggcctt gccccagtcc 180
tcaaagactt cticgtgcgg ctactgacg agttctacgt gctgcgggca gcacagctgg 240
ccctggtcta tgtgtccag gaccctacag aggagcaaca ggacctctc ctcagggaca 300
tgctgaaaa atggetcttc ctgccgttcc atgatgaact gaggaggagac ctcgggcgcc 360
agttctctgt cctcaactg ccagcgggtg tggacttaaa gcctggtggg gacgtgctga 420
caagcgacgc cacggaggag atccagcgtc tgggacccgc ctgctttgcc aactggcagg 480
aggccgcaga gctcctggac cgagccttcc tgcaaccgga ggatttggat gagcctgcgc 540
ggcgagcat caccgagcct ctgcgccgtc gcaagtaccg agtagaccgg gatgtcggcg 600
ggagcggggc gaaacggcgc gactctggtg aacccagggg ggacgcgggt acaagggcgg 660
agctctggtg actcccagg taggagtggg gaccggagct ctggtgacac caaagtaccg 720
gtgcacgacc gaggttgatg accctcccga aggaaccgg 759

```

<210> 18
 <211> 443
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<220>
 <221> různé vlastnosti
 <222> (46)..(46)
 <223> jakýkoliv nukleotid

<400> 18
 acgaggtcaa ccttggctac acagggagtc tgaggacagc atgggntaca agaaaccctc 60
 tctcaaaacc aaacaaggcc tggcagtact agtgcacttg ggaggcagag gaacaacagc 120
 gaccaggatg aagtgagac agaggcagag ctgagccgcc ggtagagaa tcgtcttgtg 180
 ctactgttct tcggtgctgg ggcctgtccc cagtgccagg ccttcgcccc agtcctcaaa 240
 gacttcttcg tgcggctcac tgatgagttc tacgtgctac gggcagcaca gctggccctg 300
 gtctatgtgt cccaggaccc tacagaggag caacaggacc tgtcctccg ggacatgcct 360
 gaaaagtggc tcttcctgcc gttccatgat gacctgagga gtaataaaaa ttagagggtg 420
 tggctcaaaa aaaaaaaaaa aaa 443

<210> 19
 <211> 889
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19
 acgccgcgct gtccccagca cccaacccag gttaccatgg cctccctgtt ctctggccgc 60
 atcctgatcc gcaacaatag cgaccaggac gagctggata cggaggctga ggtcagtcgc 120
 aggctggaga accggctggg gctgctgttc tttggtgctg gggcttgcc acagtgccag 180
 gccttcgtgc ccatcctcaa ggacttcttc gtgcggctca cagatgagtt ctatgtactg 240
 cgggcggtc agctggccct ggtgtacgtg tcccaggact ccacggagga gcagcaggac 300
 ctgttcctca aggacatgcc aaagaaatgg ctttcctgc ctttgagga tgatctgagg 360
 agggacctcg ggcgccagtt ctcatggag cgctgcccgg cggtcgtggg gctcaagccg 420
 gacggggacg tgctcactcg cgacggcgcc gacgagatcc agcgctggg caccgcctgc 480
 ttcgccaact ggcaggaggc ggccgaggtg ctggaccgca acttccagct gccagaggac 540
 ctggaggacc aggagccacg gagcctcacc gagtgcctgc gccgccacaa gtaccgcgtg 600
 gaaaaggcgg cgcgaggcgg cgcgaccggg gggaggggct ggggacggag gccggggccc 660
 ggggggctgt actgaccgct ggggtggagca gaggggaggg gattggtgga agaacaacaa 720
 ccacacgcag ccagcaccag gtatcccgac taggggagac agggcgaaga cctgacccaa 780
 agcacaacca ccggggacac taaacgactc aactcaatcc tgtgggcacc aggacaccgc 840

aaaaaaaaac aaaaaagca aaatgcaaaa aaagacagga catacgacg 889

<210> 20

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
 tgtcctcggg tctcaggtgg ctgcgtgtct ggcctatggt tgacattctg ggcgagcggc 60
 acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg 120
 tggcactgta cttcgcgcg gcccgggtgcg cgccgagccg cgacttcacg ccgctgctct 180
 gcgacttcta tacggcgctg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtggctct 240
 tcgtgtcagc cgacggcagc tcccaggaga tgctggactt catgcgcgag ctgcatggcg 300
 cctggctggc gctgcccttc cacgaccctt accggcacca ttgctgtg 348

<210> 21

<211> 340

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21
 tgtcctcggg tctcaggtgg ctgctgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc 60
 acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg 120
 tggcactgta cttcgggcg gccggtgcg gccgagccgc gattcacgcc gctgctctgc 180
 gacttctata cggcgctggt ggccgagcgc ggggccgcgc cttcgaagtg gtcttcgtgt 240
 cagccgacgg cagctcccag gagatgctgg acttcatgcg cgagctgatg gcgcctggct 300
 ggcgctgcct tccacgaccc ctaccggcac agccggagcc 340

<210> 22

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22
 tgtcctcggg tctcaggtgg ctgctgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc 60
 acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg 120

 tggcactgta cttcgggcg gccggtgcg gccgagccgc cgacttcacg ccgctgctct 180
 gcgacttcta tacggcgctg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtggctt 240
 tcgtgtcagc cgacggcagc tgccaggaga tgctggactt catgcgcgag ctgcatggcg 300
 cctggctggc gctgcccttc cacgaaccct accggcaacg gagtctcg 348

<210> 23

<211> 350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23
 tgtcctcggg tctcaggtgg ctgcgtgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc 60
 acctgggtgac ctgtaagggc gcgacgggtgg aggccgagggc ggcgctgcag aacaaggtgg 120
 tggcactgta cttcgcggcg gcccgggtgcg cgccgagccg cgacttcacg ccgctgctct 180
 gcgacttcta tacggcgctg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtggctt 240
 tcgtgtcagc cgacggcagc tgccaggaga tgcttggaact tcatgcgcga gctgcattgc 300
 gcctggccttg gcgctgccct tccacgaccc ctaccggcaa cggagtctcg 350

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 24
 tctatgtgtc ccaggaccct acag 24

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 25
 tttatgcaca agtagtacca ggacag 26

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 26

cgggatccat ggcattctctc ttctctggac gc

32

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 27

ggaattctca cctcctcagt tcatcatgga a

31

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Adaptérová sekvence

<400> 28

tgttaccaat ctgaagtggg agcggccgac aatttttttt tttttttttt

50

<210> 29

<211> 14

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Adaptérová sekvence

<400> 29

aattcggcac gagg

14

<210> 30

<211> 10

<212> DNA

<213> Umělá sekvence
 <220>
 <223> Adaptérová sekvence

<400> 30
 cctcgtgccg

10

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 31
 gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 32
 ctattacgtc aagcctgtag cc

22

<210> 33
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer

<400> 33
 catcctcatc tttcttcct tc

22

<210> 34
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<400> 34
gccagcgttt tctgcctttt ac

22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<400> 35
aagccctgcc tgctctaaca tc

22

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutická kompozice, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství polypeptidu zvoleného ze souboru zahrnujícího SEKV. ID. č. 2, SEKV. ID. č. 4, SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8, SEKV. ID. č. 10, SEKV. ID. č. 12 a SEKV. ID. č. 14 a farmaceuticky přijatelný nosič.
2. Farmaceutická kompozice, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství nukleové kyseliny zvolené ze souboru sestávajícího ze SEKV. ID. č. 1 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 3 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 5 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 7 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 9 nebo její kódující oblasti a farmaceuticky přijatelný nosič.
3. Způsob diagnostiky retinální dystrofie u člověka, **v y z n a č e n ý t í m**, že zahrnuje:

detekci in vitro nebo ex vivo transkripce mediátorové RNA transkribované z DNA kódující RDCVF1 nebo RDCVF2 cDNA, uvedené v SEKV. ID. č. 5 nebo její kódující oblasti, SEKV. ID. č. 7 nebo její kódující oblasti nebo SEKV. ID. č. 13 nebo její kódující oblasti v oku člověka, přičemž snížená transkripce vzhledem ke transkripci v oku individua netrpícího retinální dystrofií znamená, že uvedený člověk je diagnostikován jako trpící retinální dystrofií, nebo alternativně zahrnuje

měření in vitro nebo ex vivo množství polypeptidu RDCVF1 nebo RDCVF2 obsahujícího aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8 nebo SEKV. ID. č. 14 v tyčinkách oční sítnice člověka, přičemž přítomnost sníženého množství uvedeného polypeptidu vzhledem k množství polypeptidu v normální oční tkáni znamená, že uvedený člověk je diagnostikován jako trpící retinální dystrofií.
4. Rekombinantní polypeptid sestávající z aminokyselinové sekvence uvedené v SEKV. ID. č. 2 nebo z rekombinantního polypeptidu kódovaného nukleotidovou sekvencí SEKV. ID. č. 1 nebo její kódující oblasti, nebo sestávající z aminokyselinové sekvence uvedené v SEKV. ID. č. 4 nebo z rekombinantního polypeptidu kódovaného nukleotidovou sekvencí SEKV. ID. č. 3 nebo její kódující oblasti.

5. Způsob produkce RDCVF polypeptidu podle nároku 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje

5 kultivaci hostitelské buňky obsahující inkorporovaný expresní vektor obsahující exogenně-
odvozený polynukleotid kódující uvedený polypeptid za podmínek dostatečných k expresi uve-
deného polypeptidu v hostitelské buňce, čímž dojde k produkci exprimovaného polypeptidu, a
izolaci polypeptidu produkovaného buňkou.

6. Rekombinantní protilátka nebo její fragment, který specificky váže aminokyselinovou sek-
venci uvedenou v SEKV. ID. č. 2, SEKV. ID. č. 4, SEKV. ID. č. 6, SEKV. ID. č. 8, SEKV. ID. č.
10, SEKV. ID. č. 12 nebo SEKV. ID. č. 14.

7. Fragment protilátky podle nároku 6, kterým je fragment Fab nebo F(ab')₂.

8. Rekombinantní protilátka podle nároku 6, kterou je monoklonální protilátka.

15

15 výkresů

20

Obr. 1

Myší RdCVFI cDNA: SEKV. ID. Č. 1

```

1 ATCGGATCCCTCTCTGGGTCCCCAGCTCCTTGCATACTGCTACCATGGCA 50
51 TCTCTCTTCTCTGGACGCATCTTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGATGA 100
101 AGTGGAGACAGAGGCAGAGCTGAGCCGTAGGTTAGAGAATCGTCTGGTGT 150
151 TGCTGTTCTTCGGCGCCGGCGCCTGTCCCCAGTGCCAGGCCTTTGCCCA 200
201 GTCCTCAAAGACTTCTTCGTGCGGCTCACTGACGAGTTCTACGTGCTGCG 250
251 GGCAGCACAGCTGGCCCTGGTCTATGTGTCCCAGGACCCCTACAGAGGAGC 300
301 AACAGGACCTCTTCTCCTCAGGGACATGCCTGAAAAATGGCTCTTCCTGCCG 350
351 TTCCATGATGAACTGAGGAGGTGAGGCCCCAGGGAAGACCAGGGAGGGCT 400
401 TCCTGGAGAAGGCATTTCCCTGGAGGTTTACTGTCTCTGGTACTACTTGTG 450
451 CATAAAGAGGTATTCTCCTC 468

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 2

```

1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51 APVLKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF
101 LPFHDELRR

```

Obr. 2

Myší RdCVF1L cDNA: SEKV. ID. Č. 3

```

1 CCCCAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
51 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG
101 CTGAGCCGTA GGTAGAGAA TCGTCTGGTG TTGCTGTCTC TCGGCGCCGG
151 CGCCTGTCCC CAGTGCCAGG CCTTTGCCCC AGTCCTCAAA GACTTCTTCG
201 TGCGGCTCAC TGACGAGTTC TACGTGCTGC GGGCAGCACA GCTGGCCCTG
251 GTCTATGTGT CCCAGGACCC TACAGAGGAG CAACAGGACC TCTTCCTCAG
301 GGACATGCCT GAAAAATGGC TCTTCCTGCC GTTCCATGAT GAACTGAGGA
351 GGGACCTCGG GCGCCAGTTC TCTGTCCGTC AACTGCCAGC GGTGTGTGTA
401 CTTAAGCCTG GTGGGGACGT GCTGACAAGC GACGCCACGG AGGAGATCCA
451 GCGTCTGGGA CCCGCCTGCT TTGCCAACTG GCAGGAGGCC GCAGAGCTCC
501 TGGACCGCAG CTTCTCTGCA CCGGAGGATT TGGATGAGCC TGCGCGGCCG
551 AGCATCACCG AGCCTCTGCG CCGTCGCAAG TACCGAGTAG ACCGGGATGT
601 CGGCGGGAGC GGGGCGAAAC GCGCGGACTC TGGTGAACCC CAGGGGGACG
651 CGGGTACAAG GGCGGAGCTC TGGTGACTCC CAGGGTAGGA GTGGGGACCG
701 GAGCTCTGGT GACACCAAAG TACCGGTGCA CGACCGAGGT TGATGACCTT
751 CCCGAAGGAA CCGG

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 4

```

1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51 APVLKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF
101 LPFHDELRRD LGRQFSVRQL PAVVVLKPGG DVLTSDATEE IQRLGPACFA
151 NWQEAAELLD RSFLQPEDLD EPARRSITEP LRRRKYRVDR DVGGSGAKRR
201 DSGEPQGDAG TRAEIW

```

Obr. 3

Humánní RdCVFI cDNA: SEKV. ID. Č. 5

```

1   CCCAGCACCC AACCAGGTT ACCATGGCCT CCCTGTTCTC TGGCCGCATC
51  CTGATCCGCA ACAATAGCGA CCAGGACGAG CTGGATACGG AGGCTGAGGT
101 CAGTCGCAGG CTGGAGAACC GGCTGGTGCT GCTGTTCTTT GGTGCTGGGG
151 CTTGTCCACA GTGCCAGGCC TTCGTGCCCA TCCTCAAGGA CTTCTTCGTG
201 CGGCTCACAG ATGAGTTCTA TGTACTGCGG GCGGCTCAGC TGGCCCTGGT
251 GTACGTGTCC CAGGACTCCA CGGAGGAGCA GCAGGACCTG TTCCTCAAGG
301 ACATGCCAAA GAAATGGCTT TTCCTGCCCT TTGAGGATGA TCTGAGGAGG
351 TGA

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 6

```

1   MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51  VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKKWLF
101 LPFEDDLRR

```

Obr. 4

Humánní RdCVF1L cDNA: SEKV. ID. Č. 7

```

1   CCGGGGACCA CACGCCGCGC TGTCCCCAGC ACCCAACCCA GGTTACCATG
51  GCCTCCCTGT TCTCTGGCCG CATCCTGATC CGCAACAATA GCGACCAGGA
101 CGAGCTGGAT ACGGAGGCTG AGGTCAGTCG CAGGCTGGAG AACCGGCTGG
151 TGCTGCTGTT CTTTGGTGCT GGGGCTTGTC CACAGTGCCA GGCCTTCGTG
201 CCCATCCTCA AGGACTTCTT CGTGCGGCTC ACAGATGAGT TCTATGTACT
251 GCGGGCGGGT CAGCTGGCCC TGGTGTACGT GTCCCAGGAC TCCACGGAGG
301 AGCAGCAGGA CCTGTTCTTC AAGGACATGC CAAAGAAATG GCTTTTCTTG
351 CCCTTTGAGG ATGATCTGAG GAGGGACCTC GGGCGCCAGT TCTCAGTGGA
401 GCGCCTGCCG GCGGTCGTGG TGCTCAAGCC GGACGGGGAC GTGCTCACTC
451 GCGACGGCGC CGACGAGATC CAGCGCCTGG GCACCGCCTG CTTCCGCAAC
501 TGGCAGGAGG CGGCCGAGGT GCTGGACCGC AACTTCCAGC TGCCAGAGGA
551 CCTGGAGGAC CAGGAGCCAC GGAGCCTCAC CGAGTGCCTG CGCCGCCACA
601 AGTACCGCGT GGAAAAGGCG GCGCGAGGCG GCGCGGACCC CGGGGGAGGG
651 GGTGGGGAGG AGGGCGGGGC CGGGGGGCTG TTCTGA

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 8

```

1   MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51  VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKKWLF
101 LPFEDDLRRD LGRQFSVERL PAVVVLKPDG DVLTRDGADE IQRLGTACFA
151 NWQEAAEVLD RNFQLPEDLE DQEPRLTEC LRRHKYRVEK AARGGRDPGG
201 GGGEEGGAGG LF

```

Obr. 5

Myší RdCVF2 cDNA: SEKV. ID. Č. 9

```

1  ATAAATAGA GGGTGGGAGA GGTGATGGC GTGGCTCTGC TTTTGGTGC
51  GGGGCACCCA GCTGTCATCG CTGCTGTCGC AGCTTCTGGA GTGGCCACTG

101 TGCTCTCTCC TCCCTTCGGC TCAAGGTGAG CTGTTCCAGC AGAAGGCGGG
151 GCTGAGAGGC GCCTAGTGCT GCGGGAGGCT CAGTGTCTATC TTCCAGCTAA
201 CAGGTGGCCG TGCAGCCCAG GGCTCGTCTC TCCACTGTGT CCTCTTCACG
251 CCGAGCTCGT GCGGATGGTG GACGTGCTGG GCGGGCGGGC CCTGGTGACC
301 CCGGAGGGCA CCGTGGTGGA GGCCGAGGTG GCGCTGCAGA ACAAGGTGGT
351 AGCTTTGTAC TTTGCGGCGG GCCGGTGCTC GCCCAGCCGC GACTTCACGC
401 CGCTGCTCTG CGACTTCTAC ACGGAGCTGG TGAGCGAGGC GCGGCGGCCC
451 GCTCCCTTCG AGGTGGTTTT CGTGTCGGCA GACGGCAGTG CCGAGGAGAT
501 GTTGGACTTC ATGCGCGAGC TGCACGGCTC CTGGCTGGCA TTGCCCTTCC
551 ACGACCCCTA CCGGCAGTGA GTGGGGACCC AGGGGTCATG GGGCTGGCGC

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 10

```

1  MVDVLGGRRL VTREGTVVEA EVALQNKVVA LYFAAGRCSP SRDFTPLLCD
51  FYTELVSEAR RPAPFEVVFV SADGSAEEML DFMRELHGSW LALPFHDPYR
101 Q

```

Obr. 6:

Myší RdCVF2L cDNA: SEKV. ID. Č. 11

```

1  TTGACTCTGG TGGGTAGAGA GGGTTTGCAA GGCAGGATAA AATAGAGGGT
51  GGGAGAGGTT GATGGCGTGG CTCTGCTTTT TGGTGGGGG CACCAGCTGT
101 CATCGCTGCT GTCGCAGCTT CTGGAGTGGC CACTGTGCTC TCTCTCCCT
151 TCGGCTCAAG GTGAGCTGTT CCAGCAGAAG GCGGGGCTGA GAGGCGCCTA
201 GTGCTGCGGG AGGCTCAGTG TCATCTTCCA GCTAACAGGT GCGCGTGCAG
251 CCCAGGGCTC GTCTCTCCAC TGTGTCTCTC TCACGCCGAG CTCGTGGCGA
301 TGGTGGACGT GCTGGGCGGG CCGCGCCTGG TGACCCGGGA GGGCAGGCTG
351 GTGGAGGCGG AGGTGGCGCT GCAGAACAAAG GTGGTAGCTT TGTACTTTGC
401 GCGGGGCGCG TGCTCGCCCA GCCGCGACTT CACGCCGCTG CTCTGCGACT
451 TCTACACGGA GCTGGTGAGC GAGGCGCGGC GGCCCGCTCC CTTGAGGTG
501 GTTTTCGTGT CCGCAGACGG CAGTGCAGAG GAGATGTTGG ACTTCATGCG
551 CGAGCTGCAC GGCTCCTGGC TGGCATTGCC CTTCACGAC CCCTACCGGC
601 ATGAACTGAA GAAGAGGTAC GAAATCACCG CCATCCCCAA GCTGGTGGTC
651 ATCAAGCAGA ACGGAGCTGT CATCACCAAC AAAGGGCGGA AGCAGATCCG
701 AGAGCGCGGG CTAGCTTGCT TTCAGAACTG GGTGGAAGCA GCCGATGTTT
751 TCCAAAACCT CTCGGGGTGA CCAGGGCAGT TGCTGGAAGT TCAGGGCAAC
801 TATCTTCAAA AAGGGCTTAG CTGGTTCCCT TCTCTGCTGA GGAATGTCAT
851 TGTAGAGTCA CCATGCTGTG ACAGAGAGCA TAACTGCTC AGGAAAGAAC
901 TACGTCTGCC CCCTGTGGGT CCTAGAGCTC CGTTGAATGT TTATTCTTAA
951 CACCTTCTC CACCGTGCC TAGGATCCAG GACACATCAG CCACGAGTTA
1001 ACAGAACTCT ATGCAAGATG CTCTTTCCTA CAGGAAATTT CTTTGATAAA
1051 TTGACCTATG GAGGTGATAC ATTTCTGAT GACATTTTGT TGATGCTTTG
1101 GTAAACGTAT TTATTACTCG GGTGTGTAGA CTGTGTAATT TAATAAACCA
1151 AACTCACAC TTG

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 12

```

1  MVDVLGGRRL VTREGTVVEA EVALQNKVVA LYFAAGRCSP SRDFTPLLCD

51  FYTELVSEAR RPAPFEVVFV SADGSAEEML DFMRELHGSW LALPFHDPYR
101 HELKKRYEIT AIPKLVVIQ NGAVITNKGR KQIRERGLAC FQNWVEADV
151 FQNFSG

```

Obr. 7

Humánní RdCVF2 cDNA: SEKV. ID. Č. 13

```

1  GTGTGGGCGG GGGCAGTTG GGGGAGGGTG CAGAGACCTG AGGGCTTGAG
51  GTTGCCCTGGC TGGCCCCGCT CCCAGAGGCG GGTGCCGCGC TGTCGCCCCAG
101 GTATCTGGGG TCTCTGGTGT CTGAGTGTCT CATTGTGCGC GCGAACACAA
151 TTGCTCCAGC CACAGGCGAG GCCTGGCCAA GGTGTGGGCG CATCTAGGGC
201 AGGTCTTGAG AGGTCCAGCG CCCGGTGGTG CGGACAGAGG CGGGGCACCG
251 CGGCGCTCGC CGCCGCCTCC CCGCAGGTGA TCATCCTCCT GCAGGTGTCC
301 TCGGGTCTCA GGTGGCTGCG TGTCTGCGCC ATGTTTGACA TTCTGGGCGA
351 GCGGCACCTG GTGACCTGTA AGGCGCGGAC GGTGGAGGCC GAGGCGGCGC
401 TGCAGAACAA GGTGGTGGCA CTGTACTTCG CGGCGGCCCG GTGCGCGCCG
451 AGCCGCGACT TCACGCCGCT GCTCTGCGAC TTCTATACGG CGCTGGTGGC
501 CGAGGCGCGG CGGCCCGCGC CCTTCGAAGT GGTCTTCGTG TCAGCCGACG
551 GCAGCTGCCA GGAGATGCTG GACTTCATGC GCGAGCTGCA TGGCGCCTGG
601 CTGGCGCTGC CCTTCCACGA CCCCTACCGG CAACGGAGTC TCGCTCTGTT
651 GCCCAGGCTG GAGTGCAGTG GCGTGATCTT AGCTCACTGC AACCTTTGCC
701 TCCTGGGTTT AAGTGATTCT CTAGCCTTAG CCTCCTGAGC ATCTGGGACT
751 ACAGCCATTG CTGTGAATTA CGTGAGGGAA AGATATTGAA GAGGAGTTGG
801 AACTCCGAG AGTGCAGCTG TTCTCCCCC GCACCATCCG TGTCTGCAT
851 TCTGCGAGTC TGTGCTCATT AACAAATGTC TGTGACCATG TGACTCAGCA
901 ATCCTGCTGC TGGGTATATA CCCGAAAGAA AGGAAAAGGA AGCCAGTATA
951 TTGAAGAGGT ATCTGCACCC CCATGTTTAT TGCAGCACTG TTCACAACAG
1001 CCAAGATTTG GAAGCAACCT AAGTGTCAT CAACAGATGA ATGGATAAAG
1051 AAAACGTGGT ACATATACAC AATGGAGTAC TCTTCAGCCA TTAATAAAT
1101 GAGATTCTGT CATTTGCAAT AATATAGATG GAAAAGGAGG CCCTTATGTG
1151 AAGTGAAATA AGCCAGGCAC AGAAAGACAA ACATCACATG TTCTCACTTA
1201 TTTGTGGGAT CTAATGATCA AAACAATTGA ACTCTTGGAC ATAGAGAGTA
1251 GAAGGTTGGT TACCAGAAGC TGGAAAGGAA AGTGGGGTTG GGAGGAAGGT
1301 GGAATGGTT AATAGGTACA AAAAAATACA AAGAATAAAT AAGACCTAAT
1351 ATTTGATAGC ACAACAGTGT GACTACTGTC AATAATCATT TAATTGTACA
1401 TTTAAAAATA ACTATAATTG CATTTGTTGT AACACAAAAG ATAAATGCTT
1451 GAGGAGAAAA AAAAAAAAAA AA

```

Polypeptid: ATG k TGA: SEKV. ID. Č. 14

```

1  MVDILGERHL VTCKGATVEA EAALQNKVVA LYFAAARCAP SRDFTPLLCD
51  FYTALVAEAR RPAPFEVVFV SADGSCQEML DFMRELHGAW LALPFHDPYR
101 QRSLLALLPRL ECSGVILAHC NLCLLGSSDS LALAS

```

Obr. 8

Analýza programem „Pile up“ krátkých sekvencí:

```

1
mRdCVF1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF 50
hRdCVF1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
mRdCVF2 MVDVLGGRRRL VTREG....T VVEAEVA..L QNKVVALYFA AGRCSPSRDF
hRdCVF2 MVDILGERHL VTCKG....A TVEAEAA..L QNKVVALYFA AARCAPSRDF

```

```

51
mRdCVF1 APVLKDDFFVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF 100
hRdCVF1 VPILKDDFFVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LKDMPPKKWLF
mRdCVF2 TPLLCDFYTE LVSE..ARRP APFEVVFVSA DGSAAEMLDF MRELHGSWLA
hRdCVF2 TPLLCDFYTA LVAE..ARRP APFEVVFVSA DGSCQEMLDF MRELHGAWLA

```

```

101
mRdCVF1 LPFHDELRR 143
hRdCVF1 LPFEDDLRR
mRdCVF2 LPFHDPYRQ
hRdCVF2 LPFHDPYRQR SLALLPRLEC SGVILAHCNL CLLGSSDSL A LAS

```

Analýza programem „Pile up“ dlouhých sekvencí:

```

1
mRdCVF1L MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF 50
hRdCVF1L MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
mRdCVF2L MVDVLGGRRRL VTREG....T VVEAEVA..L QNKVVALYFA AGRCSPSRDF
hRdCVF2 MVDILGERHL VTCKG....A TVEAEAA..L QNKVVALYFA AARCAPSRDF

```

```

51
mRdCVF1L APVLKDDFFVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF 100
hRdCVF1L VPILKDDFFVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LKDMPPKKWLF
mRdCVF2L TPLLCDFYTE LVSE..ARRP APFEVVFVSA DGSAAEMLDF MRELHGSWLA
hRdCVF2 TPLLCDFYTA LVAE..ARRP APFEVVFVSA DGSCQEMLDF MRELHGAWLA

```

```

101
mRdCVF1L LPFHDELRRD ...LGRQFSV RQLPAVVVLK PGGDVLTSDA TEEIQRGLGPA 150
hRdCVF1L LPFEDDLRRD ...LGRQFSV ERLPAVVVLK PDGDVLTRDG ADEIQRGLGTA
mRdCVF2L LPFHDPYRHE ...LKKRYEI TAIPKLVVIK QNGAVITNKG RKQIRERGLA
hRdCVF2 LPFHDPYRQR SLALLPRLEC SGV...ILAH CNLCLLGSSD SLALAS

```

```

151
mRdCVF1L CFANWQEAAE LLDRSFLOPE DLDEPARRSI TEPLRRRKYR VDRDVGGSAGA 200
hRdCVF1L CFANWQEAAE VLDRNFQLPE DLEDQEPRSL TECLRRHKYR VEKAARGG..
mRdCVF2L CFQNWVEAAD VFQNFSG
hRdCVF2

```

```

201
mRdCVF1L KRRDSGEPQG DAGTRAEW 219
hRdCVF1L ..RDPGGGGG EEGGAGGLF
mRdCVF2L
hRdCVF2

```

Obr. 9

SEKV. ID. Č. 26: 5' cgggatccATGGCATCTCTCTTCTCTGGACGC 3'

SEKV. ID. Č. 27: 5' ggaattcTCACCTCCTCAGTTCATCATGGAA 3'

Obr. 10

	1		50
RdCVF1	MASLFSGRIL	IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG	AGACPQCQAF
RdCVF2	MVDVLGGRRL	V....TREGT VVEAEVA..L QNKVVALYFA	AGRCSPSRDF
	51		100
RdCVF1	APVLKDFVR	LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF	LRDMPEKWLF
RdCVF2	TPLLCDFYTE	LVSE..ARRP APFEVVFVSA DGSAAEMLDF	MRELHGSWLA
	101		
RdCVF1	LPFHDELRR		
RdCVF2	LPFHDPYRQ		

Obr. 11

bc016199	myší	RdCVF2	
bg707818	humánní	RdCVF2	
	1		50
bc016199	MVDVLGGRRL	VTREGTVVEA EVALQNKVVA LYFAAGRCSP	SRDFTPLLCD
bg707818	MVDILGERHL	VTCKGATVEA EAALQNKVVA LYFAAARCAP	SRDFTPLLCD
	51		100
bc016199	FYTELVSEAR	RPAPFEVVFV SADGSAEML DFMRELHGSW	LALPFHDPYR
bg707818	FYTALVAEAR	RPAPFEVVFV SADGSCQEML DFMRELHGAW	LALPFHEPYR
	101	120	
bc016199	Q*		
bg707818	QRLALLPRL	ECSGVILAH*	

Obr. 12

Jméno:	mRdCVF2	myší sekvence	bc016199
Jméno:	be552141	homo sapiens	
Jméno:	bi517442	homo sapiens	
Jméno:	bg707818	homo sapiens	
Jméno:	bi603812	homo sapiens	

mRdCVF2				ATGGT	GGACGTGCTG
be552141	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG
bi517442	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG
bg707818	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG
bi603812	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG
mRdCVF2	GGCGGCGGGC	GCCTGGTGAC	CCGGGAGGGC	ACGGTGGTGG	AGGCCGAGGT
be552141	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC
bi517442	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC
bg707818	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC
bi603812	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC
mRdCVF2	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TAGCTTTGTA	CTTTGCGGCG	GGCCGGTGCT
be552141	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCGGTGCG
bi517442	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	G.CCGGTGCG
bg707818	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCGGTGCG
bi603812	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCGGTGCG
mRdCVF2	CGCCCAGCCG	CGACTTCACG	CCGCTGCTCT	GCGACTTCTA	CACGGAGCTG
be552141	CGCCGAGCCG	CGACTTCACG	CCGCTGCTCT	GCGACTTCTA	TACGGCGCTG
bi517442	CGCCGAGCCG	CGA.TTCACG	CCGCTGCTCT	GCGACTTCTA	TACGGCGCTG
bg707818	CGCCGAGCCG	CGACTTCACG	CCGCTGCTCT	GCGACTTCTA	TACGGCGCTG
bi603812	CGCCGAGCCG	CGACTTCACG	CCGCTGCTCT	GCGACTTCTA	TACGGCGCTG
mRdCVF2	GTGAGCGAGG	CGCGGCGGCC	CGCTCCCTTC	GAGGTGGTTT	TCGTGTGCGC
be552141	GTGGCCGAGG	CGCGGCGGCC	CGCGCCCTTC	GAAGTGGTCT	TCGTGTGAGC
bi517442	GTGGCCGAGG	...CGCGGGG	CCGCGCCTTC	GAAGTGGTCT	TCGTGTGAGC
bg707818	GTGGCCGAGG	CGCGGCGGCC	CGCGCCCTTC	GAAGTGGTCT	TCGTGTGAGC
bi603812	GTGGCCGAGG	CGCGGCGGCC	CGCGCCCTTC	GAAGTGGTCT	TCGTGTGAGC
mRdCVF2	AGACGGCAGT	GCGGAGGAGA	TGT.TGGACT	TCATGCGCGA	GCTGCACGGC
be552141	CGACGGCAGC	TCCCAGGAGA	TGC.TGGACT	TCATGCGCGA	GCTGCATGGC
bi517442	CGACGGCAGC	TCCCAGGAGA	TGC.TGGACT	TCATGCGCGA	GCTG.ATGGC
bg707818	CGACGGCAGC	TGCCAGGAGA	TGC.TGGACT	TCATGCGCGA	GCTGCATGGC
bi603812	CGACGGCAGC	TGCCAGGAGA	TGCTTGGACT	TCATGCGCGA	GCTGCATGGC
mRdCVF2	TCCTGGC.TG	GCATTGCCCT	TCCACGACCC	CTACCGGCAG	TGA
be552141	GCCTGGC.TG	GCGCTGCCCT	TCCACGACCC	CTACCGGCAC	CATTGCTGTG
bi517442	GCCTGGC.TG	GCGCTG.CCT	TCCACGACCC	CTACCGGCAC	AGCCGGAGCC
bg707818	GCCTGGC.TG	GCGCTGCCCT	TCCACGAACC	CTACCGGCAA	CGGAGTCTCG
bi603812	GCCTGGCTTG	GCGCTGCCCT	TCCACGACCC	CTACCGGCAA	CGGAGTCTCG

Obr. 13

Analýza programem „Pile up“

Váha mezery: 5

Váha délky mezery: 1

Jméno: RdCVFI
 Jméno: bg299078
 Jméno: ai716631
 Jméno: bg294111
 Jméno: be108041 Rev
 Jméno: bg395178

```

      1                                     50
RdCVFI1 -----
bg299078 -----
ai716631 -----
bg294111 -----
be108041 ACGAGGTCAA CCTTGGCTAC ACAGGGAGTC TGAGGACAGC ATGGGNTACA
bg395178 -----
      51                                     100
RdCVFI1 -----
bg299078 CCCCAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
ai716631 TAAGACGGAT CCCCAGCTAC GTAGTCGGGA ATTCGGCAGC AGGGGCCGCA
bg294111 ---CAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
be108041 AGAAACCCTC TCTCAAAACC AAACAAGGCC TGGCAGTACT AGTGCACTTG
bg395178 TCCCCAGCAC CCAACCCAGG TTACCATGGC CTCCCTGTTT TCTGGCCGCA
      101                                     150
RdCVFI1 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG
bg299078 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG

```

ai716631	TCTTGATCAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
bg294111	TCTTGATCAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
be108041	GGAGGCAGAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
bg395178	TCCTGATCCG	CAACAATAGC	GACCAGGACG	AGCTGGATAC	GGAGGCTGAG

	151				200
RdCVF1	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	TTGCTGTTCT	TCGGCGCCGG
bg299078	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	TTGCTGTTCT	TCGGCGCCGG
ai716631	CTGAGCCGCC	GGTTAGAGAA	TCGTCTTGTG	CTACTGTTCT	TCGGTGCTGG
bg294111	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	<u>.TGCTGTTCT</u>	TCGGCGCCGG
be108041	CTGAGCCGCC	GGTTAGAGAA	TCGTCTTGTG	<u>CTACTGTTCT</u>	TCGGTGCTGG
bg395178	GTCAGTCGCA	GGCTGGAGAA	CCGGCTGGTG	CTGCTGTTCT	TTGGTGCTGG

	201				250
RdCVF1	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CCTTTGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg299078	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	<u>CC.TTGCCCC</u>	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
ai716631	GGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	<u>CCTTCGCCCC</u>	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg294111	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	<u>CC.TTGCCCC</u>	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
be108041	GGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	<u>CCTTCGCCCC</u>	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg395178	GGCTTGTCCT	CAGTGCCAGG	CCTTCGTGCC	CATCCTCAAG	GACTTCTTCG

	251				300
RdCVF1	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg299078	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
ai716631	TGCGGCTCAC	TGATGAGTTC	TACGTGCTAC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg294111	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
be108041	TGCGGCTCAC	TGATGAGTTC	TACGTGCTAC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg395178	TGCGGCTCAC	AGATGAGTTC	TATGTACTGC	GGGCGGCTCA	GCTGGCCCTG

	301				350
RdCVF1	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
bg299078	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
ai716631	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TGTTCCCTCCG
bg294111	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
be108041	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TGTTCCCTCCG
bg395178	GTGTACGTGT	CCCAGGACTC	CACGGAGGAG	CAGCAGGACC	TGTTCCCTCAA

	351				400
RdCVF1	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
bg299078	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTCCCACTGA	TGAACTGAGG
ai716631	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
bg294111	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
be108041	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
bg395178	GGACATGCCA	AAGAAATGGC	TTTTTCCTGCC	CTTTGA.GGA	TGATCTGAGG

	401				450
RdCVF1	AGGTGA~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
bg299078	AGGTGAGGCC	CCAGGGAAGA	CCAGGGAGGG	CTTCCTGGAG	AAGGCATTTTC
ai716631	AGAGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCCGT~~~~	~~~~~	~~~~~
bg294111	AGGGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCTGTCCGT	CAACTGCCAG	CGGTTGTGGT
be108041	AGTAATAAAA	ATTAGAGGTT	GTGGCTCAAA	AAAAAAAAAA	AAAA~~~~~
bg395178	AGGGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCAGTGGAG	CGCCTGCCGG	CGGTCGTGGT

	451				500
RdCVF1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
bg299078	CCTGGAGGTT	TACTGTCTCTG	GTAATACTTG	TGCACATAAG	AGGTATTCTT
ai716631	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
bg294111	ACTTAAGCCT	GGTGGGGACG	TGCTGACAAG	CGACGCCACG	GAGGAGATCC
be108041	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
bg395178	GCTCAAGCCG	GACGGGGACG	TGCTCACTCG	CGACGGCGCC	GACGAGATCC

	501		550
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	CCACACCAAC	CACAGGCGAC	AACAACACAC
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	AGCGTCTGGG	ACCCGCCTGC	TTTGCCAACT
be108041	-----	-----	-----
bg395178	AGCGCCTGGG	CACCGCCTGC	TTGCGCCAACT
		GGCAGGAGGC	GGCCGAGGTG
	551		600
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	TTCCATCACA	GCCCCTGAC	GCCAGACAGC
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	CTGGACCGCA	GCTTCCCTGCA	ACCGGAGGAT
be108041	-----	-----	-----
bg395178	CTGGACCGCA	ACTTCCAGCT	GCCAGAGGAC
		CTGGAGGACC	AGGAGCCACG
	601		650
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	GAAAAACACA	GGTAGTCTCA	CAGGCCTGCC
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	CAGCATCACC	GAGCCTCTGC	GCCGTCGCAA
be108041	-----	-----	-----
bg395178	GAGCCTCACC	GAGTGCCTGC	GCCGCCACAA
		GTACCGCGTG	GAAAAGGCGG
	651		700
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	GAGCACAAGA	GCGATGGCTA	CAAGCCTCAA
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	TCGGCGGGAG	CGGGGCGAAA	CGGCGCGACT
be108041	-----	-----	-----
bg395178	CGCGAGGCGG	CGCGACCCGG	GGGAGGGGCT
		GGGGACGGAG	GCCGGGGCCC
	701		750
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	AGGTGGGGAC	CGTAGGCCCC	ACTCCCCGGG
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	GCGGGTACAA	GGGCGGAGCT	CTGGTGACTC
be108041	-----	-----	-----
bg395178	GGGGGGCTGT	ACTGACCGCT	GGGTGGAGCA
		GAGGGAGGGG	GATTGGTGGA
	751		800
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	GGAGCTCTGG	TGACACCAAA	GTACCGGTGC
be108041	-----	-----	-----
bg395178	AGAACAACAA	CCACACGCAG	CCAGCACCAG
		GTATCCCGAC	TAGGGGAGAC
	801		850
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	TCCCGAAGGA	ACCGG-----	-----
be108041	-----	-----	-----
bg395178	AGGGCGAAGA	CCTGACCCAA	AGCACAACCA
		CCGGGGACAC	TAAACGACTC
	851		900
RdCVF1	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----
bg294111	-----	-----	-----

```

be108041 ~~~~~
bg395178 AACTCAATCC TGTGGGCACC AGGACACCGC AAAAAAAAC AAAAAAGCA

          901                               929
RdCVF1 ~~~~~
bg299078 ~~~~~
ai716631 ~~~~~
bg294111 ~~~~~
be108041 ~~~~~
bg395178 AAATGCAAAA AAAGACAGGA CATACGACG

```

Obr. 14

BG299078

```

ATCGGATCCTCTCTGGGTCCCCAGCTCCTTGCCATCTGCTACCATGGCATCTCTCTCTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TAGCCTAGGAGAGACCCAGGGGTCGAGGAACGTATGACGATGGTACCGTAGAGAGAAGAG

TGGACGCATCTTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGATGAAGTGGAGACAGAGGCAGAGCT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ACCTGCGTAGAACTAGTCCTTGTGTGCTGGTCTTACTTCACCTCTGTCTCCGTCTCGA

GAGCCGTAGGTTAGAGAATCGTCTGGTGTGCTGTCTTTCGGCGCCGGCGCCTGTCCCCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCGGCATCCAATCTCTTAGCAGACCACAACGACAAGAAGCCGCGCCGCGGACAGGGGT
+T
GTGCCAGGCCTTGCCCCAGTCTCAAAGACTTCTTCGTGCGGGCTCACTGACGAGTTCTAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACGGTCCGGAACGGGGTCAGGAGTTTCTGAAGAAGCACGCCGAGTGACTGCTCAAGATG

GTGCTGCGGGCAGCACAGCTGGCCCTGGTCTATGTGTCCCAGGACCCTACAGAGGAGCAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CACGACGCCCCGTCGTGTGACCGGGACCAGATACACAGGGTCCTGGGATGTCTCCTCGTT
removed
CAGGACCTCTTCTCAGGGACATGCCTGAAAAATGGCTCTTCTGCGCTCCCACTGATGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTCCTGGAGAAGGAGTCCCTGTACGGAATTTTACCGAGAAGGACGGCAGGGTGACTACT

ACTGAGGAGGTGAGGCCCCAGGGAAGACCAGGGAGGGCTTCCTGGAGAAGGCATTTCCCT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGACTCCTCCACTCCGGGGTCCCTTCTGGTCCCTCCCGAAGGACCTCTTCCGTAAAGGGA

GGAGGTTTACTGTCTGTTACTACTTGTGCACTAAAGAGGTATTCCTCCACACCAACCAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTCCAAATGACAGGACCATGATGAACACGTGATTTCTCCATAAGGAGGTGTGGTTGGTG

AGGCGACAACAACACACAAGAGGTGTCCCATCCGCTCTTCCATCACAGCCCACTGACGCC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCCGCTGTGTTGTGTGTTCTCCACAGGGTAGGCGAGAAGGTAGTGTGCGGTGACTGCGG

AGACAGCATCGCGACGCTCACGGCTCAGAAAAACACAGGTAGTCTCACAGGCCTGCCATC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTGTCTGTAGCGCTGCGAGTGCCGAGTCTTTTGTGTCCATCAGAGTGTCCGACGGTAG

CTAATACTGGCCACCCTGAGCACAAGAGCGATGGCTACAAGCCTCAAGGCTAGAATCTAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GATTATGACCGGTGGGACTCGTGTCTCGCTACCGATGTTCGGAGTTCGGATCTTAGATT

AACCACGAGGTGGGGACCGTAGGCCCCACTCCCCGGGAGCGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 702
TTGGTGCTCCACCCCTGGCATCCGGGGTGAGGGGCCCTCGCG

```

Obr. 15

BG294111

```

CAGCTCCTTGCATACTGCTACCATGGCATCTCTCTTCTCTGGACGCATCTTGATCAGGAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTCGAGGAACGTATGACGATGGTACCGTAGAGAGAAGAGACCTGCGTAGAACTAGTCCTT

CAACAGCGACCAGGATGAAGTGGAGACAGAGGCAGAGCTGAGCCGTAGGTTAGAGAATCG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTTGTCGCTGGTCCTACTTCACCTCTGTCTCCGTCTCGACTCGGCATCCAATCTCTTAGC
      +T                               +T
TCTGGTGTGCTGTTCTTCGGCGCCGGCGCCTGTCCCCAGTGCCAGGCCCTTGCCCCAGTCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGACCACACGACAAGAAGCCGCGCCGCGGACAGGGGTACGGTCCGGAACGGGGTCAGG

TCAAAGACTTCTTCGTGCGGCTCACTGACGAGTTCTACGTGCTGCGGGCAGCACAGCTGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
AGTTTCTGAAGAAGCACGCCGAGTGACTGCTCAAGATGCACGACGCCCGTCGTGTGACCC

CCCTGGTCTATGTGTCCCAGGACCCCTACAGAGGAGCAACAGGACCTCTTCCTCAGGGACA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGGACCAGATACACAGGGTCTTGGGATGTCTCCTCGTTGTCTTGAGAGAAGGAGTCCCTGT

TGCCTGAAAAATGGCTCTTCTGCGGTTCCATGATGAACTGAGGAGGGACCTCGGGCGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ACGGACTTTTTTACCGAGAAGGACGGCAAGGTACTACTTGACTCCTCCCTGGAGCCCAGCG

AGTTCTCTGTCCGTCAACTGCCAGCGGTTGTGGTACTTAAGCCTGGTGGGGACGTGCTGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TCAAGAGACAGGCAGTTGACGGTCGCCAACACCATGAATTCCGACCACCCCTGCACGACT

CAAGCGACGCCACGGAGGAGATCCAGCGTCTGGGACCCGCCCTGCTTTGCCAACTGGCAGG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GTTTCGCTGCGGTGCCTCCTCTAGGTGCGAGACCCTGGGCGGACGAAACGGTTGACCGTCC

AGGCCGCGAGAGCTCCTGGACCGCAGCTTCTGCAACCGGAGGATTTGGATGAGCCTGCGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCCGGCGTCTCGAGGACCTGGCGTCGAAGGACGTTGGCCTCCTAAACCTACTCGGACGCG

GGCGCAGCATCACCGAGCCTCTGCGCCGTGCAAGTACCGAGTAGACCGGGATGTGCGCG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CCGCGTCGTAGTGGCTCGGAGACGCGGCAGCGTTTATGGCTCATCTGGCCCTACAGCCGC

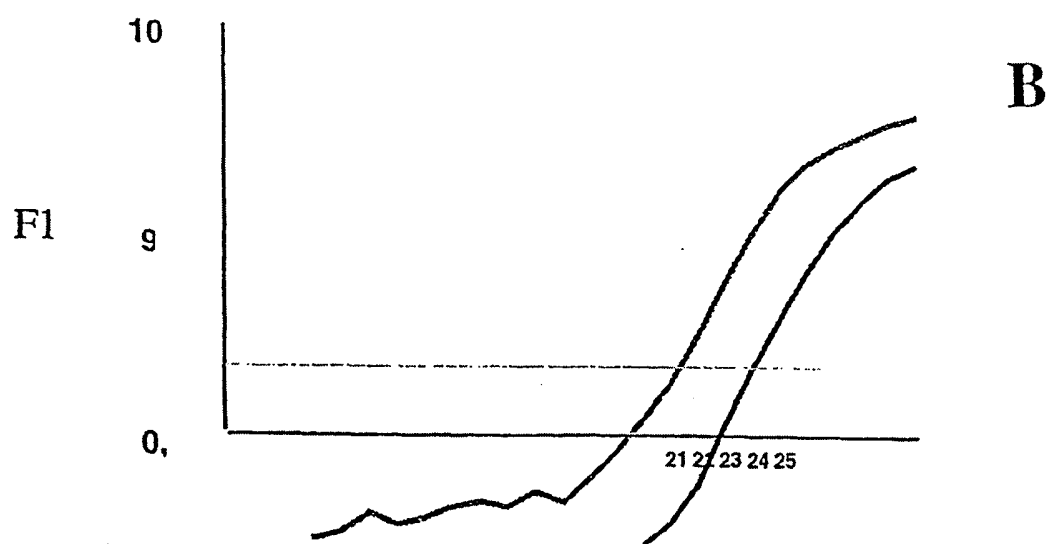
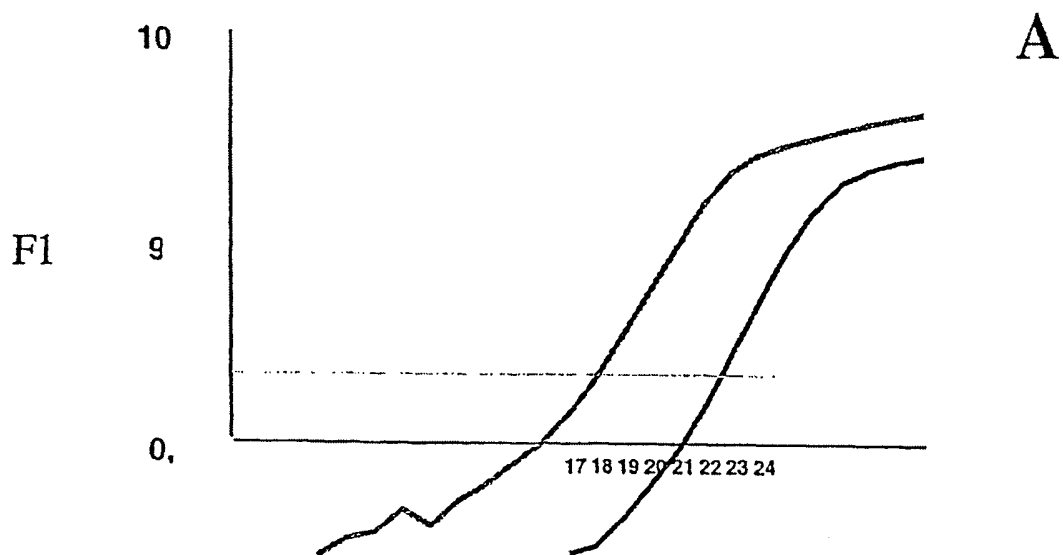
GGAGCGGGGCGAAACGGCGCGACTCTGGTGAACCCAGGGGGACGCGGGTACAAGGGCGG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCTCGCCCCGCTTTGCCGCGCTGAGACCACTTGGGGTCCCCCTGCGCCCATGTTCCCGCC

AGCTCTGGTGACTCCCAGGGTAGGAGTGGGGACCGGAGCTCTGGTGACACCAAAGTACCG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TCGAGACCACTGAGGGTCCCATCCTCACCCCTGGCCTCGAGACCACTGTGGTTTCATGGC

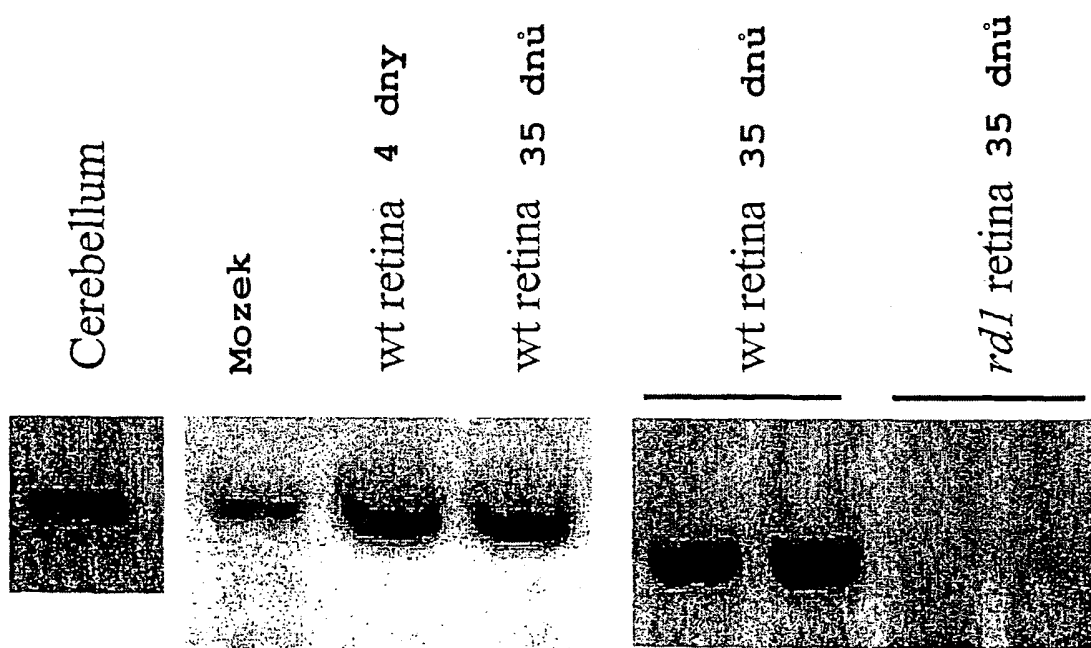
GTGCACGACCGAGGTTGATGACCCTCCCGAAGGAACCGG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 759
CACGTGCTGGCTCCAATACTGGGAGGGCTTCCTTGGCC

```

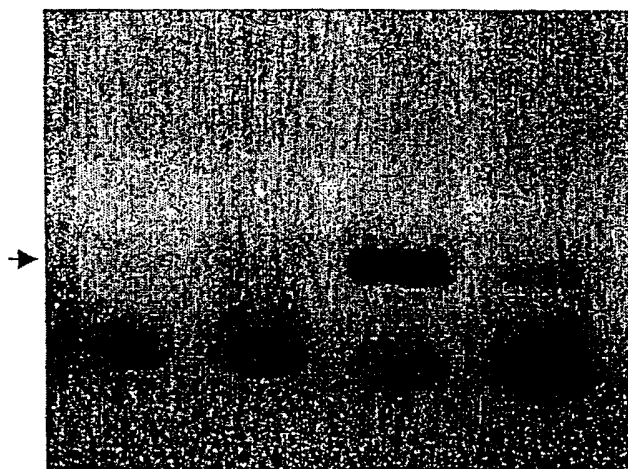
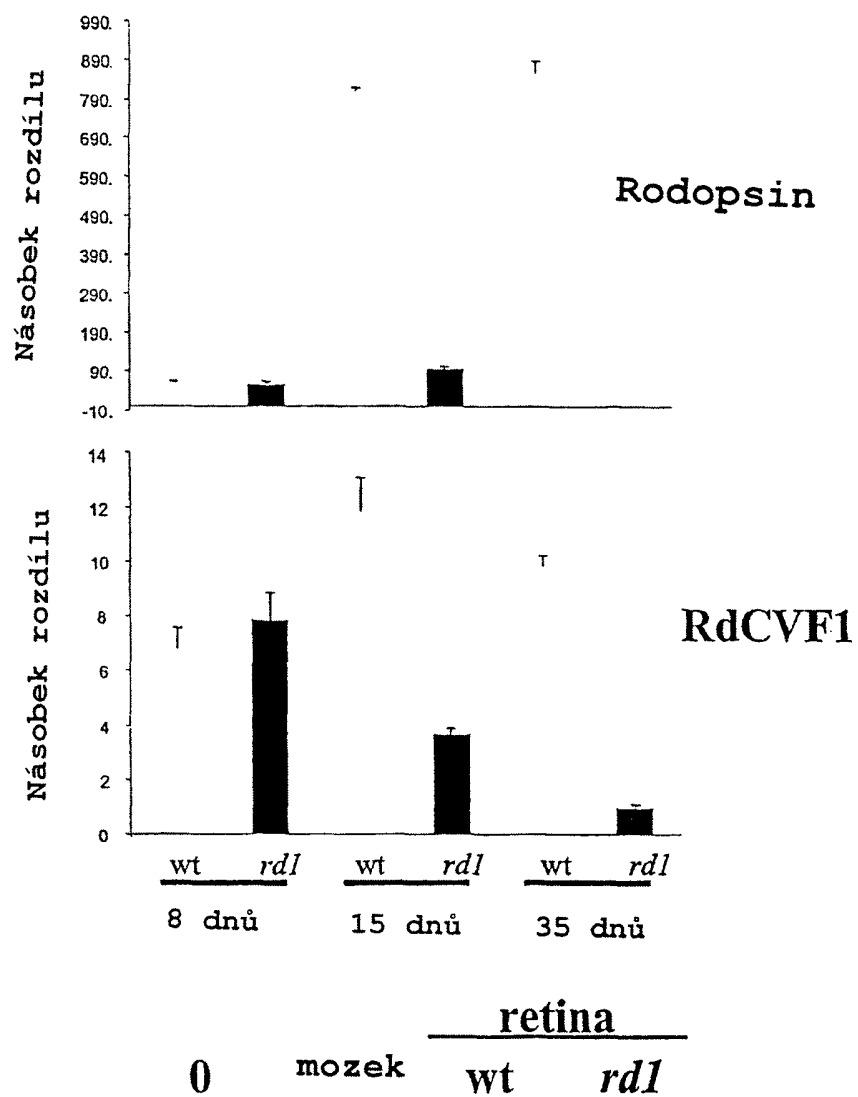
Obr. 16



Obr. 17



Obr. 18



Konec dokumentu