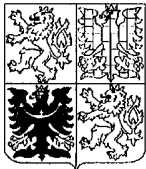


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.11.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.11.1997**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/066565**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)
(86) PCT číslo: **PCT/US98/25044**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/26664**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1958

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 48/00
A 61 K 35/00
C 12 N 15/11
C 12 N 15/63
C 12 N 15/85
G 01 N 33/53

(71) Přihlašovatel:

IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC., Ames, IA, US;

(72) Původce:

Minion Chris F., Ames, IA, US;
Hsu Tsungda, Bronx, NY, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Rekombinantní vakcína proti Mycoplasma
hyopneumoniae**

(57) Anotace:

Bílkovina z Mycoplasma hyopneumoniae, připravená z rekombinantní DNA nebo syntetickým způsobem, sekvence DNA kódující bílkovinu, expresní vektor a transformovaná hostitelská buňka obsahující sekvence DNA, způsob léčby prasat za účelem zabránění enzootické pneumonie za použití vakcín, diagnostické testy detekující přítomnost infekce Mhyo u prasat, založené na stanovení bílkoviny nebo protilátek proti této bílkovině.

Rekombinantní vakcína proti *Mycoplasma hyopneumoniae*

PV 2000-1958
D699

Tato přihláška nárokuje prospěch z přihlášky US Provisional Application No. 60/066565 zaregistrované 26. listopadu 1997, která je tímto začleněna jako reference.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*, neboli Mhyo), zejména antigenní bílkoviny Mhyo. Obzvláště se pak vynález týká vakcíny určené k ochraně před enzootickými pneumoniemi, zejména enzootickými pneumoniemi u prasat.

Dosavadní stav techniky

Enzootická pneumonie u prasat, také nazývaná mykoplazmatová pneumonie, je způsobena mikroorganismem Mhyo. Jedná se o chronické onemocnění nekončící úmrtím, které postihuje prasata v každém věku. Infikovaná prasata mají pouze mírné příznaky ve formě kašle a horečky, ale toto onemocnění má významný ekonomický dopad kvůli snížení účinnosti krmení a nepřibývání na váze. Enzootická pneumonie je přenášena z prasete na prase nosními dýchacími cestami prostřednictvím vzduchem přenášených organismů vypuzených z plic infikovaných prasat. Primární infekce mikroorganismem Mhyo může být následována sekundární infekcí dalšími druhy mykoplazmat (*Mycoplasma hyorhinis* a *Mycoplasma flocculare*) stejně tak jako ostatními bakteriálními patogeny.

Mhyo je malý prokaryotický mikrob schopný volné existence, ačkoli je často nacházen ve spojení s eukaryotickými buňkami, protože nezbytně potřebuje exogenní steroly a mastné kyseliny. Tyto požadavky obecně vyžadují růst v médiích obsahujících sérum. Mhyo je obklopeno buněčnou membránou, ale nikoli buněčnou stěnou. Genom Mhyo obsahuje přibližně 1000000 párů bází.

Fyzikální spojení mykoplazmat s buněčným povrchem hostitelské buňky je základem pro rozvoj a perzistenci enzootické pneumonie. Mhyo infikuje respirační trakt prasat, kolonizuje tracheu, bronchy a bronchioly. Mykoplasma produkuje ciliostatický faktor, který způsobuje zastavení pohybu ciliární výstelky respiračního traktu. Nakonec cilie degenerují, což vede u prasat ke zvýšení náchylnosti vůči sekundárním patogenům. U infikovaných zvířat jsou pozorovány charakteristické léze tvořené fialovými až šedými splývajícími oblastmi. Průzkum u poražených zvířat odhalil léze u 30-80% prasat. Výsledky získané z 37 stád v 13 státech ukazují, že u 99% stád se vyskytují prasata s pneumonickými lézemi, které jsou typické pro enzootickou pneumonii. Z tohoto důvodu jsou nezbytná účinné preventivní a léčebná opatření.

Antibiotika, jako jsou například tiamulin, trimetoprim, tetracykliny a linkomycin jsou do určité míry prospěšná, ale jsou drahá a vyžadují dlouhodobé podávání. Navíc nebylo prokázáno, že antibiotika účinně zabraňují rozšíření nebo reinfekci mikroorganismem Mhyo. Prevence pomocí udržování stád bez patogenů je někdy možná, ale často dochází k reinfekci mikroorganismem Mhyo. V důsledku závažných ekonomických důsledků pneumonie prasat jsou hledány vakcíny proti Mhyo, stejně tak jako diagnostické metody, které by ukazovaly na přítomnost infekce. Na trh byly uvedeny vakcíny obsahující preparáty organismů mykoplazmat, které rostou v médiích obsahujících sérum, avšak jsou drahé a mají možné nežádoucí účinky v důsledku komponent séra přítomných v imunizujícím materiálu. Ostatní pokusy přípravy vakcíny nebyly úspěšné a toto onemocnění zůstává široce rozšířeno.

Co je zapotřebí, je vakcína proti infekci mykoplazmaty u prasat, která by měla ekonomický význam. Také je zapotřebí diagnostického testu k detekci přítomnosti infekce prasat mykoplazmaty u stád prasat.

Popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká purifikovaného nebo izolovaného proteinu *Mycoplasma hyopneumoniae* P102 připraveného rekombinantním nebo syntetickým způsobem, a dále polypeptidů nebo peptidů, které jsou částí tohoto proteinu, a které po podání praseti vyvolávají tvorbu protilátek vázajících se na Mhyo. Přednostní P102 protein a polypeptidy mají aminokyselinovou sekvenci, která je zobrazena na Obr. 1, nebo obsahují fragment této sekvence.

Vynález se dále týká rekombinantních molekul DNA, které jsou užitečné v přípravě proteinu P102 a výše zmíněných polypeptidů. Přednostní rekombinované molekuly DNA jsou charakterizované sekvencí DNA, která je vybrána ze sekvencí zobrazených na Obr. 2, DNA sekvencemi kódujícími aminokyselinové sekvence zobrazené na Obrázcích 1 a 5, DNA sekvencemi, které hybridizují s jakoukoli z těchto DNA sekvencí a které kódují Mhyo P102, DNA sekvencemi kódujícími antigen Mhyo kódovaný těmito DNA sekvencemi a DNA sekvencemi, které jsou degenerované jako výsledek genetického kódu výše zmíněných DNA sekvencí, a které kódují antigen Mhyo. Jsou poskytnuty také expresní vektory a hostitelské buňky obsahující proteiny nebo DNA sekvence.

Předkládaný vynález také zahrnuje vakcínu určenou pro imunizaci prasat před infekcemi způsobenými Mhyo pomocí podání vyprodukovaných a následně izolovaných P102 polypeptidů, nebo pomocí podání expresních faktorů obsahujících DNA sekvence, které jsou předmětem předkládaného vynálezu (např. formou injekcí) v množství dostatečném k vyvolání tvorby protilátek. K testování stád prasat na infekci Mhyo je poskytnut také diagnostický test na bázi P102, polypeptidů, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, nebo protilátek proti nim.

Další výhody a rysy předkládaného vynálezu vyplynou z následujícího detailního popisu, vyobrazení a příkladů, které ilustrují přednostní formy vynálezu.

Stručný popis Obrázků

Na Obrázku 1 je zobrazena aminokyselinová sekvence P102.

Na Obrázku 2 je zobrazena sekvence DNA kódující Mhyo P102.

Na Obrázku 3 je zobrazena restriční mapa klonů operonu P97.

Na Obrázku 4 je zobrazena restriční mapa klonů P102.

Na Obrázku 5 je zobrazeno uspořádání přepsaných aminokyselinových sekvencí P102 se sekvencemi několika klonů.

Na Obrázku 6 jsou zobrazeny otevřené čtecí rámce (open reading frames) kontigu P97 a próby používané k prohlížení genomické knihovny.

Na Obrázku 7 jsou zobrazeny výsledky hybridizační analýzy DNA Mhyo s próbami z Obrázku 6.

Detailní popis přednostních forem vynálezu

Nyní budou detailně popsány přednostní formy vynálezu, které spolu s vyobrazeními a následujícími příklady slouží k vysvětlení principů vynálezu. Tyto formy vynálezu jsou popsány dostatečně detailně, aby ti, kdož jsou znalí v oboru, byli schopni vynález použít. Mohou být použity i další formy vynálezu a mohou být provedeny strukturální a chemické změny, aniž by došlo k odchýlení od principu a rozsahu předkládaného vynálezu.

V této přihlášce jsou použity následující zkratky: aa, aminokyselina(y); Ab, protilátka(y); bp, pár(y) bází; CHEF, uzavřené homogenní elektrické pole; H., Hamophilus; kb, kilobáze(s) nebo 1000 bází; Kn, kanamycin; LB, Luria-Bertoniho médium; M., Mykoplazma; mAb, monoklonální Ab; ORF, otevřený čtecí rámec (open reading frame); PCR, polymerázová řetězová reakce; ^R, rezistentní/rezistence; Tn, transpozón(y); ::, nové spojení (fúze nebo inzerce). Označení jedno- a tří- písmenového kódu aminokyselin je uvedeno níže v Tabulce 1.

Tabulka 1

| Označení aminokyselinového kódu | | | | | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|---------------|-------------------|---------------------|
| Aminokyselina | Tří-písmenový kód | Jedno-písmenový kód | Aminokyselina | Tří-písmenový kód | Jedno-písmenový kód |
| Alanin | Ala | A | Leucin | Leu | L |
| Arginin | Arg | R | Lysin | Lys | K |
| Asparagin | Asn | N | Methionin | Met | M |
| Kyselina aspartová | Asp | D | Fenylalanin | Phe | F |
| Cystein | Cys | C | Prolin | Pro | P |
| Kyselina glutamová | Glu | E | Serin | Ser | S |
| Glutamin | Gln | Q | Threonin | Thr | T |
| Glycin | Gly | G | Tryptofan | Trp | W |
| Histidin | His | H | Tyrosin | Tyr | Y |
| Izoleucin | Ile | I | Valin | Val | V |

Termín "protein" používaný v následujícím popisu se týká mikrobiálně exprimovaného proteinu, který byl separován, izolován, nebo purifikován z jiných bílkovin, celých bakterií a buněčných substancí pomocí konvenčních prostředků, jako je preparativní chromatografie, imunologická separace nebo chromatografie za použití kolony s chelátem kovů. Termín "mutant", jak je používaný v následujícím popisu se týká aminokyselinové nebo DNA sekvence s menšími modifikacemi nebo konzervativními rozdílnostmi, které mají za následek ekvivalentní funkci ve srovnání s nativním Mhyo P102.

Termín "konzervativní rozdílnosti" se týká nahrazení aminokyselinového rezidua jiným, biologicky podobným reziduem, nebo substituce nukleotidů v DNA sekvenci za účelem dosažení stejného výsledku. Příklady konzervativních rozdílností zahrnují substituci jednoho hydrofobního rezidua, jako je například izoleucin, valin, leucin nebo methionin za jiné, nebo substituci jednoho polárního rezidua za jiné, jako je například substituce argininu za lysin, kyseliny glutamové za kyselinu aspartovou, nebo glutaminu za asparagin, a podobně. Termín

„konzervativní rozdílnosti“ také zahrnuje použití substituované aminokyseliny za nesubstituovanou mateřskou aminokyselinu za předpokladu, že protilátky proti substituovanému polypeptidu také reagují s nesubstituovaným polypeptidem.

Předkládaný vynález se týká proteinu P102 z *Mycoplasma pneumoniae* v izolované, purifikované a/nebo rekombinantní formě a použití tohoto proteinu či jeho fragmentů jako vakcíny nebo diagnostického prostředku u prasat. Protein P102, u kterého bylo prokázáno, že způsobuje u prasat imunologickou reakci chránící před virulentními mikroorganismy, byl izolován, charakterizován a pojmenován vynálezci předkládajícími tento vynález. V rozsahu předkládaného vynálezu jsou také DNA sekvence odpovídající rekombinantnímu proteinu P102 a expresní vektory a hostitelské buňky obsahující tyto sekvence. Je také poskytnuta vakcína obsahující izolovaný, purifikovaný a/nebo rekombinantní protein P102 nebo DNA sekvence kódující protein P102 určená k imunizaci prasat proti infekci způsobené Mhyo. Dále je poskytnut také diagnostický prostředek na bázi proteinu P102, který je užitečný na testování stád prasat na přítomnost infekce.

Jako výchozí materiál k produkci proteinu P102, který je předmětem předkládaného vynálezu může být použit jakýkoli kmen Mhyo. Vhodné kmeny Mhyo mohou být získány z různých zdrojů zahrnujících bakteriální banky, jako jsou například American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) a NRRL Culture Collection (Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL). ATCC samotné nabízí šest kmenů Mhyo na prodej. Protože infekce tímto mikroorganismem je široce rozšířena, je možné získat kmeny také izolací z plicních sekretů nebo plicní tkáň nemocných zvířat po inokulaci do vhodného kultivačního média.

Co se týká vyobrazení, na Obrázku 1 je uvedena sekvence Mhyo proteinu P102. Jak je patrné, protein P102 se skládá z 904

aminokyselin, jejichž rozložení je detailně uvedeno níže v Tabulce 2. P102 nemá cystein a jeho izoelektrický bod (pI) má hodnotu 9,28. Protein byl označen jako P102 kvůli jeho molekulové váze 102,3 kDa. Je míněno, že protein P102 může být transmembránový protein pro přítomnost domnělých 25 aminokyselinových transmembránových domén v oblasti jeho N-konce (aa 10-34). Zbytek proteinové sekvence tvoří pravděpodobně jeden nebo více α -helixů pro přítomnost vysokého procenta (-64%) aminokyselin tvořících α -helix.

Tabulka 2

| Složení aminokyselin přepsané sekvence P102 | | | | | |
|--|--------------------|-----------------------|---|--------------------|-----------------------|
| Aminokyselina | Počet ^a | Procento ^b | Aminokyselina | Počet ^a | Procento ^b |
| Nepolární: | | | Polární: | | |
| A | 45 | 4,98 | G | 33 | 3,65 |
| V | 52 | 5,75 | S | 86 | 9,51 |
| L | 103 | 11,39 | T | 54 | 5,97 |
| I | 62 | 6,86 | C | 0 | 0 |
| P | 28 | 3,10 | Y | 29 | 3,21 |
| M | 6 | 0,66 | N | 74 | 8,19 |
| F | 44 | 4,87 | Q | 47 | 5,20 |
| W | 9 | 1,00 | | | |
| | | | Bázické | | |
| Kyselé: | | | K | 114 | 12,61 |
| D | 50 | 5,53 | R | 17 | 1,88 |
| E | 50 | 5,53 | H | 1 | 0,11 |
| ^a Celkový počet jednotlivých aminokyselin | | | ^b Procento každé aminokyseliny | | |

Proteiny nebo polypeptidy, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mají aminokyselinovou sekvenci zobrazenou na Obrázku 1, nebo fragmenty či mutanty řečené sekvence schopné vyvolat protilátkovou nebo jinou imunitní odpověď na podkladě reakce s epitopem aminokyselinové sekvence uvedené na Obr. 1. Mutace buďto aminokyseliny, nebo kódující DNA mohou být užitečné při zlepšování výtěžku proteinů, jejich imunogenity, antigenity, nebo kompatibility s různými purifikačními schémata, adjuvantními látkami nebo způsoby podání. Takové fragmenty a mutace, syntetické nebo rekombinantní, jsou charakterizovány

jedním nebo více antigenními místy nativního Mhyo proteinu P102.

Proteiny nebo polypeptidy, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být purifikované nebo izolované proteiny nebo polypeptidy extrahované z buněk Mhyo, nebo to mohou být rekombinantní proteiny nebo polypeptidy produkované hostitelskými buňkami transformovanými DNA sekvencemi kódujícími tyto rekombinantní proteiny nebo polypeptidy. Mělo by být samozřejmě rozuměno, že tyto proteiny nebo polypeptidy mohou zahrnovat rezidua, která nemají vztah k Mhyo. Rekombinantní proteiny nebo polypeptidy, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být například fúzní proteiny obsahující část bílkoviny odvozenou z expresního faktoru nebo jiného zdroje a část bílkoviny odvozenou z Mhyo. Rekombinantní polypeptidy a jejich fúzní proteiny mohou také obsahovat methionin jako výchozí aminokyselinu. Požadavkem je, aby finální polypeptidy vykazovaly antigenitu nativního Mhyo P102 proteinu.

Rekombinantní DNA sekvence složená z 2712 párů bází a kódující protein P102, který je předmětem předkládaného vynálezu, je zobrazena na Obr. 2. Vyobrazená sekvence je netemplátové vlákno s 5' koncem nalevo a 3' koncem napravo, takže mRNA vytvořená z komplementárního templátového vlákna bude mít identickou sekvenci se sekvencí uvedenou na Obr. 2 s výjimkou substituce uracilu (U) za thymin (T). Počáteční (ATG) a stop (TAA) kodón jsou podtrhnuty. Je zobrazeno přibližně 24 párů bází ve směru nahoru od počátečního kodónu včetně domnělé Shine Dalgarnovy sekvence (GGAGGT) 10 párů bází ve směru nahoru od počátečního kodónu, a 21 párů bází ve směru dolů od stop kodónu. Sekvence proteinu P102 se významněji neshoduje s žádnými známými sekvencemi včetně jiných genů pro bakteriální adheziny.

Předkládaný vynález se také týká sekvence DNA kódující protein, který je schopný vyvolat protilátkovou nebo jinou imunitní

odpověď (například odpověď T buněk imunitního systému), která rozpoznává epitop aminokyselinové sekvence uvedené na Obr. 1 zahrnující méně než celou DNA sekvenci a její mutanty. DNA sekvence, která je předmětem předkládaného vynálezu, může tudíž kódovat proteiny nebo polypeptidy, které jsou celými antigeny, jejich fragmenty či deriváty, nebo fúzními produkty těchto antigenů, jejich fragmentů či derivátů s jiným proteinem.

Jsou poskytnuty také rekombinantní molekuly DNA, které jsou užitečné při přípravě výše zmíněných proteinů a polypeptidů. Přednostní rekombinantní molekuly DNA jsou charakterizovány sekvencí DNA vybranou ze sekvence uvedené na Obr. 2, klonovaných nebo expresních vektorů obsahujících sekvenci kódující rekombinantní protein nebo polypeptid, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, jak je popsáno výše, DNA sekvence, které hybridizují s jakoukoli z těchto DNA sekvencí a které kódují Mhyo protein P102, DNA sekvence, které kódují antigen Mhyo kódovaný jakoukoli z výše zmíněných DNA sekvencí, a DNA sekvence, které jsou degenerované jako výsledek genetického kódu výše zmíněných DNA sekvencí a které kódují antigen Mhyo.

Příslušné DNA sekvence mohou být začleněny do jakéhokoli z širokého množství expresních vektorů za pomoci celé řady postupů, obecně prostřednictvím příslušného místa pro restriční endonukleázu. Vhodné vektory zahrnují například vektory tvořené segmenty chromozomálních, nechromozomálních a syntetických sekvencí DNA, jako jsou různé známé deriváty SV40, známé bakteriální plazmidy, například plazmid z E.coli zahrnující col E1, pCR1, pBR322, pMB9 a jejich deriváty, velké množství plazmidů hostitelských buněk, například RP4, DNA fágů, například různé deriváty fágu λ , např. NM 989 a další DNA fágy, jako jsou například M13 nebo filamentózní jednovláknové DNA fágy, plazmidy kvasinek, jako je například 2μ plazmid nebo jeho deriváty, virová DNA, jako je například baculovirus, vaccinia, adenovirus, virus drůbežního moru nebo pseudovztekliny, a

vektory odvozené z kombinace plazmidů a DNA fágů, jako jsou například plazmidy, které byly modifikovány, aby mohla být použita DNA fágů, nebo další kontrolní sekvence exprese.

V každém specifické vehikulu pro klonování či expresi mohou být zvolena různá místa pro vložení DNA sekvencí, které jsou předmětem tohoto vynálezu. Tato místa jsou obvykle určena restriční endonukleázou, která je rozštěpí. Existují různé metody pro vkládání sekvencí DNA do těchto míst, tak aby vytvořily rekombinantní molekuly DNA. Tyto metody zahrnují například dG-dC nebo dA-dT tailing, přímou ligaci, použití syntetických vazebných látek, exonukleázy a s polymerázou spřažených reakcí opravujících DNA následovaných ligací, nebo rozšíření DNA vlákna pomocí DNA polymerázy a příslušného jednovláknového templátu, které je následováno ligací. Je samozřejmé, že vehikulum pro expresi nebo klonování, které je užitečné v tomto vynálezu nemusí mít k inzerci zvoleného fragmentu DNA místo pro restriční endonukleázu, a také že tato inzerce se může provést alternativními prostředky.

Pro expresi sekvencí DNA, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou tyto sekvence DNA operativně spojeny ve vektoru pro expresi s jedním nebo více kontrolními sekvencemi pro expresi. Toto operativní spojení, které může být provedeno před nebo po vložení zvolené sekvence DNA do vehikula pro klonování, umožňuje kontrolním sekvencím pro expresi kontrolovat a podporovat expresi vložené sekvence DNA.

Za účelem exprese sekvencí DNA, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být v těchto vektorech použita celá řada kontrolních sekvencí pro expresi. Jedná se o sekvence, které kontrolují expresi sekvencí DNA, když jsou k nim operativně navázány. Tyto kontrolní sekvence pro expresi zahrnují například časný a pozdní promotor SV 40, systémy lac a trp, systém TAC nebo TRC, hlavní operátorové a promotorové oblasti fágu λ , kontrolní oblasti fd obalujícího proteinu, promotor 3-

fosfoglycerát kinázy nebo jiných glykolytických enzymů, promotery kyselé fosfatázy, např. Pho5, promotery α -spojených faktorů a další sekvence, o kterých je známo, že kontrolují expresi genů v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách nebo jejich virech, a jejich různé kombinace.

Expresní vektor také zahrnuje nekódující sekvence vazebného místa pro ribozóm pro iniciaci translace a zahrnuje také terminátor transkripce. Vektor může také zahrnovat příslušné sekvence pro amplifikaci exprese. V savčích buňkách je navíc možné amplifikovat expresní jednotky spojením genu s genem pro dehydrofolát reduktázu a použít selekci hostitelských ovariálních buněk čínského křečka.

Vektor nebo expresní vehikulum a obzvláště místa zvolená pro inzerci vybraného fragmentu DNA a expresní kontrolní sekvence použité v tomto vynálezu jsou určeny celou řadou faktorů, např. počtem míst vnímavých k specifickému restričnímu enzymu, velikostí proteinu, který má být exprimován, charakteristikami exprese, jako jsou například místa počátečních a stop kodónů ve vztahu k sekvencím vektoru, a dalšími faktory, které mohou být rozpoznány těmi, kdož jsou znalí oboru. Volba vektoru, expresní kontrolní sekvence a místa inzerce je určena rovnováhou těchto faktorů, přičemž ne všechny možnosti jsou stejně účinné pro daný případ.

V přednostní formě tohoto vynálezu mohou být použity různé klony včetně těch, které uvedeny na Obrázcích 3 až 5. Na Obr. 3 je uvedena restriční mapa různých překrývajících se klonů operonu P97, které zahrnují geny pro Mhyo proteiny P97 a P102. Tyto klony byly získány hybridizací DNA s klonovaným fragmentem z pISM1161. Je uvedena poloha strukturálního genu pro protein P97, směr jeho transkripce (šipka) a oblast DNA sekvenční analýzy (tmavý sloupec). Místa jsou uvedena v kilobázích. Restriční enzymy jsou uvedeny v následujících zkratkách: A,

AccI; B, BamHI; Bg, BglII; C, ClaI; E, EcoRI; EV, EcoRV; H, HindIII; Hn, HincII; N, NciI, SalI.

Na Obr. 4 je uvedena restriční mapa P102 příbuzných klonů, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. Fyzická mapa kontigu P97 s hranicemi genů pro proteiny P97 a P102 je uvedena jako reference a směr transkripce je zleva doprava. Homologie mezi sekvencemi DNA klonů pISM1232-34 a pISM2166 a sekvencí operonu P97 jsou uvedeny jako stínované nebo šrafované oblasti. Světle šedá barva ukazuje na vysokou (více než 95%) homologii s proteinem P102, černá barva ukazuje na nižší (méně než 75%) homologii s proteinem P102, tmavě šedá barva ukazuje na nulovou homologii s proteinem P97 a šrafované oblasti ukazují oblasti, kde nebyly dostupné informace o sekvenci DNA. Je uvedena poloha plazmidů pISM1165, pISM1168, pISM1169, pISM1170, a pISM1174 ve vztahu k pISM1232 a pISM1233. Pro každý klon nebo skupinu klonů jsou uvedeny restriční vzory a velikost je uvedena v kilobázích.

Uspořádání přepsaných aminokyselinových sekvencí P102 klonů pISM2166, pISM1232, pISM1233 a pISM1234 s nativním proteinem P102 je uvedeno na Obr. 5. Uspořádání aminokyselinových sekvencí proteinu P102 bylo provedeno za použití softwaru Clustal W alignment in MaxVector™, verze 6.0.1 (Oxford Molecular Group, Campbell, CA). Ohraničené oblasti ukazují na totožnost a podobnost sekvencí. PISM1232/3 ukazuje uspořádání pISM1232 a 1233. Sekvence pISM1232 jsou uvedeny na začátku uspořádání a sekvence pISM1233 jsou uvedeny na konci uspořádání.

Rekombinantní molekula DNA obsahující požadovaný gen operativně spojený s expresní kontrolní sekvencí může být poté použita k transformaci velkého množství příslušných hostitelských buněk za účelem exprese genu nebo jeho fragmentu v takové hostitelské (transformované) buňce a tvorby polypeptidu nebo jeho části, které jsou kódovány hybridní DNA. Rekombinantní molekula DNA

může být použita k transformaci hostitelské buňky tak, aby replikující hostitelská buňka produkovala navíc rekombinantní molekuly DNA jako zdroj genů Mhyo nebo jeho fragmentů.

Pro produkci antigenů a sekvencí DNA, které jsou předmětem tohoto vynálezu je užitečná celá řada hostitelských buněk. Tyto hostitelské buňky zahrnují například bakterie, jako jsou např. *E. coli*, *Bacillus* a *Streptomyces*, plísně jako například kvasinky a živočišné nebo rostlinné buňky v tkáňové kultuře. Výběr příslušné hostitelské buňky pro kterékoli z těchto použití je kontrolován velkým množstvím faktorů. Ty zahrnují například kompatibilitu se zvoleným vektorem, toxicitu ko-produktů, snadnost získání požadovaného polypeptidu, expresní charakteristiky, bio-bezpečnost a cenu. Z těchto faktorů jako takových se nelze absolutně rozhodnout pro hostitelskou buňku pro specifickou rekombinantní molekulu DNA nebo polypeptid. Místo toho musí být bráno v úvahu, že ne všechny hostitelské buňky mohou být stejně účinné pro expresi specifické rekombinantní molekuly DNA.

Je také samozřejmé, že sekvence DNA, které jsou vloženy do vybraných míst klonujícího nebo expresního vehikula, mohou obsahovat nukleotidy, které nejsou částí skutečného genu kódujícího požadovaný polypeptid nebo mohou zahrnovat pouze fragment celého genu pro tento protein. Je pouze požadováno, aby při použití jakékoli sekvence DNA produkovala transformovaná buňka polypeptid mající antigenicitu nativního proteinu P102.

Sekvence DNA, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být například fúzovány ve stejném čtecím rámci (reading frame) v expresním vektoru tohoto vynálezu s částí sekvence DNA kódující alespoň jeden eukaryotický nebo prokaryotický nosičový protein, nebo se sekvencí DNA kódující alespoň jednu eukaryotickou nebo prokaryotickou signální sekvenci, nebo s jejich kombinacemi. Takové konstrukce mohou pomoci v expresi

požadované sekvence DNA, mohou zlepšit purifikaci nebo umožnit sekreci, a mohou přednostně zlepšit maturaci požadovaného polypeptidu v hostitelské buňce. Sekvence DNA mohou alternativně obsahovat ATG počáteční kodón, a to samotný nebo spolu s dalšími kodóny fúzovanými přímo se sekvencí kódující první aminokyselinu požadovaného polypeptidu. Tyto konstrukce umožňují například konstrukci methionyl nebo jiného peptidyl polypeptidu, který je součástí tohoto vynálezu. Tento N-terminální methionin nebo peptid může být poté odštěpen intra- nebo extra- celulárně za pomoci celé řady známých procesů, nebo může být takový nebo jiný fúzní polypeptid použit v preparátech a metodách, které jsou předmětem tohoto vynálezu.

Příslušná sekvence DNA přítomná ve vektoru po začlenění do hostitelské buňky může exprimovat pouze část kódovaného proteinu, jehož velikost je však dostatečná k vyvolání protilátkové nebo jiné imunitní odpovědi vzniklé na podkladě rozpoznání epitopu aminokyselinové sekvence uvedené na Obr. 1. Například při použití E. coli jako hostitelského organismu je kodón UGA stop kodónem, takže exprimovaný protein může být pouze fragmentem antigenu kódovaným ve vektoru a z tohoto důvodu je preferováno, aby všechny kodóny UGA v příslušné sekvenci DNA byly zkonvertovány na kodóny neukončující replikaci. Jiným způsobem, jak obejít tento problém v hostitelské buňce, která rozpoznává kodón UGA jako stop kodón, je začlenit další sekvenci DNA, která kóduje v transformovaném organismu t-RNA přepisující kodón UGA do proteinu kódujícího sekvenci jako tryptofan.

Exprimovaný protein hostitelskou buňkou transformovanou vektorem může být izolován za pomoci metod známých v oboru a tento protein může být použit ve vakcíně k ochraně nehumánních živočichů, jako jsou například prasata, hovězí dobytek atd., před enzootickou pneumonií způsobenou Mhyo. Protein je použit v množství, které je účinné k zajištění ochrany před enzootickou pneumonií způsobenou Mhyo a může být použit

v kombinaci s vhodným fyziologicky přijatelným nosičem, jak je popsáno detailněji níže.

V přednostní formě tohoto vynálezu byla klonována sekvence genu pro P102 v expresním vektoru pTrcHis Xpress, který je dostupný od společnosti Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Hostitelská E. coli byla transformována vektorem a protein P102 produkován ve vysokých koncentracích. Vektor pTrcHis Xpress produkoval fúzní protein obsahující protein P102 fúzovaný s krátkým vedoucím peptidem s šesti histidinovými rezidui v tandemu. Buňky byly poté lyzovány a protein P102 byl purifikován chromatograficky nanesením hrubého buněčného lyzátu na kolonu s chelátem kovů, jako je například kolona ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Rekombinantní proteiny a polypeptidy, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být také použity jako antigeny pro diagnostické účely k určení, zdali biologický materiál obsahuje antigeny Mhyo, nebo protilátky proti těmto antigenům. Toto stanovení na přítomnost Mhyo infekce se typicky skládá z inkubace biologického vzorku obsahujícího protilátku, který pochází od zvířete, u kterého je podezření na přítomnost Mhyo infekce. Přítomnost této infekce je detekována pomocí značeného rekombinantního proteinu, který je předmětem předkládaného vynálezu, a detekcí vazby protilátky k tomuto značenému proteinu.

Z tohoto důvodu mohou být v tomto aspektu vynálezu rekombinantní proteiny navázány na pevnou fázi, např. na mikrotitrační destičku, na které je možno imobilizovat buňky, buněčné částice nebo rozpustné proteiny. Pevná fáze může být poté promyta vhodnými pufry s následnou aplikací vzorku obsahujícího protilátku. Pevná fáze může být poté podruhé promyta pufrem k odstranění nenavázané protilátky. Poté je přidán značený rekombinantní protein a pevná fáze je promyta potřetí k odstranění nenavázaného značeného antigenu. Množství

navázané značené látky na řečenou pevnou fázi může být poté detekováno konvenčním způsobem.

"Pevnou fázi" je míněna jakákoli pevná fáze schopná vázat antigen nebo protilátky, Dobře známé pevné fáze, neboli nosiče, zahrnují sklo, polystyren, polypropylen, polyetylen, dextran, nylon, amylázy, přirozené a modifikované celulózy (obzvláště nitrocelulózy), polyakrylamidy, agarózu a magnetit. Nosič může být pro účely předkládaného vynálezu buďto do určité míry rozpustný nebo nerozpustný. Materiál pevné fáze může mít skutečně jakoukoli strukturální konfiguraci do té míry, aby tato pevná fáze byla schopná vázat antigen nebo protilátku. Z tohoto důvodu může být konfigurace pevné fáze sférická, jako je tomu u kuliček, nebo cylindrická, jako je tomu u vnitřního povrchu zkumavky nebo vnějšího povrchu tyčinky. Povrch může být také plochý jako například ve formě tabulky, testovacího proužku atd. Přednostní pevné fáze zahrnují polystyrenové kuličky.

Jeden ze způsobů detekovatelného označení Mhyo specifické protilátky je navázání této protilátky k enzymu a použití této protilátky v enzymové imunoanalýze (EIA), nebo v enzymově vázané imunosorpční analýze (ELISA). Je-li tento enzym později exponován svému substrátu, reaguje s ním takovým způsobem, že dochází k uvolnění chemické sloučeniny, která může být detekována například spektrofotometricky, fluorometricky nebo vizuálně. Enzymy, které mohou být použity k detekovatelnému označení Mhyo specifické protilátky zahrnují, ale nejsou však pouze omezeny na křenovou peroxidázu, malát dehydrogenázu, stafylokokovou nukleázu, delta V steroid izomerázu, kvasinkovou alkohol dehydrogenázu, alfa glycerolfosfát dehydrogenázu, trioza fosfát izomerázu, alkalickou fosfatázu, aspariginázu, glukóza oxidázu, beta-galaktozidázu, ribonukleázu, ureázu, katalázu, glukóza-6-fosfát dehydrogenázu, glukoa/nylázu a acetylcholinesterázu.

Vlastní detekce může být provedena pomocí celé řady imunoanalýz. Například radioaktivním označením rekombinantního proteinu je možné detekovat vazbu protilátky pomocí radiimunoanalýzy (RIA). Radioaktivní izotop může být detekován za pomoci gama počítače nebo scintilačního počítače, nebo autoradiograficky. Izotopy, které jsou obzvláště užitečné pro účely předkládaného vynálezu, zahrnují ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S a ^{14}C , přednostně pak ^{125}I .

Je také možné označit rekombinantní protein fluorescenční sloučeninou. Pokud je fluorescenčně označený protein exponován světlu o vhodné vlnové délce, může být jeho přítomnost detekována v důsledku fluorescence. Mezi nejběžnější fluorescenční sloučeniny užívané k označování patří fluorescein, izothiocyánát, rhodamin, phycoerytherin, phycocyanin, allophycocyanin, o-ftaldehyd a fluorescamin. Protein může být také detekovatelně označen za použití kovů emitujících fluorescenci, jako jsou například ^{152}Eu , nebo jiné lanthanidy. Tyto kovy mohou být připojeny k proteinu za použití skupin vázajících kovy, jako je dietyltriaminopentaoctová kyselina (DTPA) nebo etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA).

Protein může být také detekovatelně označen navázáním k chemiluminiscenční nebo bioluminiscenční sloučenině. Přítomnost chemiluminiscenčně označeného proteinu je poté určena detekcí přítomnosti luminiscence, která vzniká v průběhu chemické reakce. Bioluminiscence je typ chemiluminiscence, která se vyskytuje v biologických systémech, v kterých katalytický protein zvyšuje účinnost chemiluminiscenční reakce. Příkladem obzvláště užitečných chemiluminiscenčních sloučenin používaných k označování jsou luminol, izoluminol, thiomatický akridiniový ester, imidazol, akridiniová sůl a oxalátový ester. Důležitými bioluminiscenčními látkami pro účely označování sloučenin jsou luciferin, luciferáza a aequorin.

Detekce označené sloučeniny může být provedena například scintilačním počítačem, pokud je detekovatelná označená sloučenina gama zářičem, nebo například fluorometricky, pokud je detekovatelná označená sloučenina fluorescenčním materiálem. V případě enzymové značky může být detekce provedena kolorimetrickými metodami, které používají substrát pro enzym. Detekce může být také provedena vizuálním srovnáním enzymatické reakce substrátu ve srovnání s podobně připravenými standardami.

Detekce míst s detekovatelně označenými protilátkami svědčí pro onemocnění nebo dysfunkční stav a může být použita k měření Mhyo ve vzorku. Absence těchto protilátek nebo jiné imunitní odpovědi svědčí o tom, že živočich nebyl ani očkovan ani infikován. Pro účely předkládaného vynálezu může být bakterie, která je detekována v tomto stanovení, přítomna v biologickém vzorku. Může být použit jakýkoli vzorek, který ji obsahuje, ovšem jedna z výhod předkládaného diagnostického vynálezu je, že nevyžaduje invazivní odstranění tkáně. Z tohoto důvodu je přednostním vzorkem biologický roztok, jako je například nosní krční nebo plicní sekret, ovšem vynález není omezen pouze na stanovení v těchto vzorcích.

Detekce in situ může být provedena v histologickém vzorku živočicha s použitím značených protilátek, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. Protilátka (nebo fragment) je přednostně zajištěna aplikací nebo přenesením značené protilátky (nebo fragmentu) k biologickému vzorku. Pomocí tohoto postupu je možné určit nejen pouze přítomnost Mhyo, ale také distribuci tohoto mikroorganismu ve vyšetřované tkáni. Za použití předkládaného vynálezu pochopí běžně zkušení pracovníci, že jakákoli z velkého množství histologických metod (jako jsou například barvicí metody) může být modifikována za účelem této in situ detekce.

Alternativně může být testován tekutý vzorek na přítomnost genu pro Mhyo protein P102 reakcí s rekombinantní nebo syntetickou sekvencí DNA obsaženou v sekvenci uvedené na Obr. 2, nebo s jakoukoli sekvencí RNA ekvivalentní k řečené DNA sekvenci. Nepřítomnost genu ukazuje na to, že živočich nebyl ani očkovan ani infikován. Test zahrnuje způsoby syntézy, amplifikaci nebo hybridizaci sekvencí nukleové kyseliny, které jsou známé v oboru.

Předkládaný vynález se také týká vakcíny tvořené rekombinantními proteiny a polypeptidy, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, nebo sekvencí DNA kódujících tyto proteiny a polypeptidy. Tato vakcína je určena imunizací nebo ochraně nehumánních živočichů, přednostně prasat, před infekcí Mhyo, zejména pak před enzootickou pneumonií. Termín "chránící" nebo "ochrana" v kontextu vakcíny pro enzootickou pneumonii, která je zde popisována, znamená, že vakcína zabraňuje enzootické pneumonii způsobené Mhyo a/nebo snižuje závažnost onemocnění.

Vakcína založená na sekvencích DNA, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být připraveny odstraněním kodónů UGA a vložení vhodné sekvence do vhodného vektoru. Vakcína může být poté podána za pomoci vhodných metod, jako jsou například bombardování částicemi, mikroinjikace, elektroporace, transfekce kalcium fosfátem, lipozomální a virová transfekce. DNA vakcíny a způsoby jejich podání jsou známé v oboru, a jsou popsány v patentech US Patent čísla 5836905, 589466 a 5580859, které jsou tímto začleněny jako reference.

Vakcína je používána ve spojení s nosičem, kterým může být jakýkoli z celé řady nosičů. Reprezentativní nosiče zahrnují sterilní vodu, salinický roztok, pufrované roztok, minerální olej, ledek, syntetické polymery atd. Ke zlepšení rozpustnosti a disperze v roztoku mohou být použity také další látky. Výběr vhodného nosiče závisí na způsobu podání vakcíny. Vakcína je

obecně používána u nehumánních živočichů, kteří jsou vnímaví k enzootické pneumonii a obzvláště se používá u prasat.

Vakcína může být používána jakýmkoli vhodným způsobem, jako je například intramuskulární, subkutánní, intraperitoneální nebo intravenózní injekce. Alternativně může být vakcína podána intranazálně nebo perorálně, jako například smísením aktivních složek s potravou nebo s vodou, přípravě tabletové formy, atd. Způsoby jako jsou například bombardování částic, mikroinjikace, elektroporace, transfekce kalcium fosfátem, lipozomální a virová transfekce jsou obzvláště vhodné pro podání vakcíny na bázi DNA sekvence. Další způsoby podání budou zřejmě osobám znalým oboru, rozsah vynálezu však není omezen na specifickou transportní formu. Vakcína může také spolu s antigenem (antigeny) nebo výše popsanými fragmenty obsahovat aktivní složky nebo adjuvantní látky (např. Freundovo nekompletní adjuvans).

Adjuvantní látky mohou být použity ke zvýšení imunogenity antigenu. Mechanismus, jak adjuvantní látky fungují, není zcela poznán. O některých se věří, že zvyšují imunitní odpověď pomalým uvolňováním antigenu zatímco jiné adjuvantní látky pracují pravděpodobně synergisticky. Mezi adjuvantními látkami, které mohou být použity patří olejové a vodní emulze, kompletní Freundovo adjuvans, nekompletní Freundovo adjuvans, *Corynebacterium parvum*, *Hemophilus*, *Mycobacterium butyricum*, hydroxid hlinitý, dextran sulfát, oxid železa, alginát sodný, Bacto-Adjuvans, určité syntetické polymery, jako jsou například polyaminokyseliny a ko-polymery aminokyselin, saponin, iota carrageenan, RegressinTM, AvridineTM, Mannite monooleát, parafínový olej a muramyl dipeptid.

Aplikace předkládaného vynálezu na specifický problém nebo prostředí je ve schopnostech osob běžně zkušených v oboru. Příklady produktů a postupů předkládaného vynálezu jsou uvedeny v následujících příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce knihovny a prohlížení

Genomická knihovna Mhyo chromozomální DNA byla zkonstruována s Tsp5091 natrávené chromozomální DNA klonované do EcoRI λ ZAP II, jak bylo popsáno dříve v publikaci autorů Minion, F.C., VanDyk, C. a Smiley, B.K., "Use of an Escherichia coli enhanced opal suppressor strain to screen a Mycoplasma hyopneumoniae library", 131 FEMS Microbiol. Letters 81-85 (1995), která je tímto začleněna jako reference. Knihovna byla vypracována za použití kmene E.coli LE392 za použití technik popsaných v publikaci autora Hanahan, D., "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", 166 J. Mol. Biol. 557-80 (1983), prohlížena byla pomocí DNA hybridizace za použití metody popsané v publikaci autorů Sambrook, J., Fritsch, E.F., a Maniatis, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) a za pomoci antisér prasat uzdravujících se z infekce Mhyo, jak je popsáno v práci autorů Minion et al.

Na Obr. 6 jsou uvedeny otevřené čtecí rámce (open reading frames) kontigu P97 a próby používané k prohlížení genomické knihovny. Rámečky označují ORF s jejich označením uvedeným níže. Stínované rámečky ukazují transkripci zleva doprava, bílé rámečky ukazují transkripci zprava doleva. Próby 1-4 použité pro hybridizační analýzu a próba 5 použitá pro prohlížení genomické knihovny jsou uvedeny pod obrázkem. Hybridizace byla prováděna přes noc při teplotě 65° s ³²P radioznačenými próbami. Jedna hybridizační próba byl 3,3 kb klonovaný fragment z pISM1161 obsahující N-terminus proteinu P97 stejně tak jako dále pokračující sekvence uvedené na Obr. 3. Druhá próba, próba 5 byl klonovaný 400 bp fragment DNA umístěný ve strukturálním genu pro protein P102, jak je uvedeno na Obr. 6.

Knihovna byla také prohlížena za pomoci sér prasat uzdravujících se z infekce Mhyo, jak bylo popsáno dříve Minionem et al. Séra uzdravujících se prasat byla získána následujícím způsobem. Inokulum bylo vytvořeno vyjmutím plíc prasat infikovaných Mhyo, jejich homogenizací a zamražením alikvót. Poté byly alikvóty inokula naředěny 1:10 steryl-fosfátovým pufrem a 10 ml roztoku bylo instilováno intratracheálně prasatům. Krev byla odebírána za účelem získání séra po 28 dnech, nebo po 56-73 dnech. Plazmidy obsahující klonované Mhyo chromozomální DNA fragmenty byly excidovány in vivo z odpovídajícího purifikovaného rekombinantního λ ZAP II fága za pomoci ExAssistTM pomocného fága (Stratagene, La Jolla, CA) a začleněny do E.coli SOLRTM (e14-(mcrA)delta(mcrCB-hsdSMR-mr^R)171 sbcC recB rec) uvrC umuC::Tn5(Kn^R) lac gyr A96 relA1 rhi-1 endA1 λ^R (F'proAB lacl¹M15)Su) podle návodu výrobce (Stratagene, La Jolla, CA).

Příklad 2

Sekvence DNA a sekvenační analýza

Sekvence DNA za pomoci Tn1000 byla provedena na plazmidech pISM1210, pISM1217 a pISM2166, jak je popsáno v publikaci autorů Strathmann, M., Hamilton, B.A., Mayeda, C.A., Simon, M.I., Meyerowitz, E.M. a Palazzolo, M.J., "Transposon-facilitated DNA sequencing", 88 Proc. Natl Acad Sci USA 1247-1250 (1991). Spojení kmenů E. coli DPWC(F⁺) a BW26 (Kn^R) bylo provedeno podle Strathmanna et al. Vložené sekvence byly zmapovány pomocí restričních enzymů SalI, EcoRV, a BamHI a série vložených sekvencí Tn1000 byla zvolena pro sekvenační reakce jako templátová DNA na základě jejich umístění a užitečnosti přidat DNA informaci do okolí sekvence proteinu P97. Sekvence DNA byla provedena podle Strathmanna et al. Za pomoci T7 a T3 vektor specifických primerových míst a Tn1000 koncově specifických primerů 186 (5'-ATATAACAACGAATTATCTCC-3') a 188 (5'-TAAGTTATACCATAAACG-3') v cyklicky sekvenačních reakcích. Všechny sekvence byly získány pomocí automatického fluorescenčního DNA sekvenátoru Model 373A (Perkin-Elmer Applied

Biosystems, Inc., Foster City, CA). Translace byla provedena pomocí mykoplazmatické translační tabulky. Hledání homologie mezi DNA a přepsanou proteinovou sekvencí bylo provedeno pomocí analýz BLASTN a BLASTP.

Příklad 3

Hybridizační analýza

Hybridizační analýza byla provedena na chromozomální DNA Mhyo natrávené enzymy HindIII, HincII, EcoRV, EcoRI a BglII. Natrávené fragmenty DNA byly separovány na 0,7% agarózových gelech a přebílotovány na nylonovou membránu. V analýze bylo použito několik P97 operon specifických prób (viz Obrázky 3 a 6), včetně 758-bp EcoRV-HindIII fragmentu proteinu P97 získaného z pISM1213 (próba 1), dále PCR produkt obsahující R1 opakující se oblast proteinu P97, která obsahuje hlavní antigenní a cilium vázající epitopy (próba 2), dále NciI-HincII (próba 3) a fragmenty HincII-KpnI (próba 4) z pISM2139.

V PCR reakční směsi obsahující 2 mM MgCl₂, 25 pmol každého primeru, 1-50 ng templátové DNA, 1,25 jednotek Taq DNA polymerázy v 50 ul 1X reakčního pufru od výrobce byly k vytvoření próby 2 použity primery TH120 (5'-AAGGTAAGAGAAGAAGTAG) a TH121 (5'-TTGTAAGTGAAAAGCCCAGTAT). PCR podmínky byly následující: DNA byla denaturována při teplotě 94°C po dobu 5 minut s následnými 35 cykly (94°C denaturace po dobu 1 minuty, ochlazení na 58°C na dobu 1,5 minuty, poté 72°C po dobu 1 minuty) a konečně 5 minut při 72°C.

Na Obrázku 7 jsou uvedeny výsledky hybridizační analýzy DNA Mhyo s próbami z Obr. 6. Každý panel reprezentuje hybridizaci s jednou próbou, jak je uvedeno na horním panelu. Pro próby 1 a 2 byla chromozomální DNA natrávena enzymem BglII. Restriktivními enzymy použitými k natrávení chromozomální DNA byly pro próby 3 a 4 HindIII (stopa 1), Hinc II (stopa 2), EcoRV (stopa 3), EcoRI (stopa 4) a BglII (stopa 5). Stopa 6 obsahovala 6 ng kontrolní plazmidové DNA natrávené enzymy používanými k izolaci

próby. Autoradiogramy byly hodnoceny za použití vysokoúčinné CCD kamery Cohu model 4900 (Cohu Inc., San Diego, CA) a počítače Macintosh IIci vybaveného videodeskou Scion Corporation (Frederick, MD). Velikost každého bandu byla určena za použití softwaru GelReader (NCSA, Urbana-Champaign, IL) a velikosti jsou uváděny v kb. Soubory TIFF byly upraveny a uspořádány v programu Adobe Photoshop a označeny v programu Aldus FreeHand (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Příklad 4

Klonování a analýza kopií genu pro protein P102

Další klony P102 byly získány klonováním purifikovaných 3,8, 4,2 a 4,8 kb EcoRI fragmentů Mhyo chromozomální DNA z agarózového gelu do EcoRI natráveného pBluescriptu II pSK (Stratagene, La Jolla, CA). Rekombinantní klony byly poté blotovány na přítomnost P102 specifických klonů za použití próby 3 (zobrazené na Obr. 6). Tyto výsledné plazmidy byly mapovány restrikčními enzymy a konce klonovaných fragmentů byly sekvenovány. Sekvenační primer (5'-GCGGCTGCTAAACTAAGACTA) byl použit k získání další informace o sekvenci 3' konce pISM1232 a pISM1234, který byl přiřazen k k sekvenci P97. Další klon pISM2166, který byl získán prohlížením genomické knihovny s antisérou prasat, která prodělala infekci, byl kompletně sekvenován a bylo zjištěno, že vykazuje významnou homologii k P102.

Příklad 5

Identifikace a charakterizace strukturálního genu P102

Všechny dřívější rekombinantní klony obsahující P97 sekvence byly identifikovány za použití monoklonální protilátky F1B6, jak je popsáno v publikaci autorů Hsu, T., Artiushin, S. a Minion, F.C., "Cloning and analysis of P97, a respiratory cilium adhesin gene of Mycoplasma hyopneumoniae", 179 J. Bacteriol. 1317-23 (1997). Za účelem získání dalších klonů obsahujících strukturální gen P97 a jeho obklopující sekvence jsme hybridizací prohlíželi genomickou knihovnu za použití

próby, která obsahovala 5' konec a sekvence ve směru nahoru od kodónu startujícího translaci. Prohlížením knihovny pomocí sér prasat, která prodělala infekci Mhyo, byl získán další klon s P102 sekvencemi. Výsledné klony byly podrobeny DNA sekvenačním a hybridizačním analýzám.

Prohlížení genomické knihovny za pomoci 3,3-kb fragmentu z pISM1161 vedlo k identifikaci klonů pISM1210, pISM1212, pISM1214 a pISM1217, jak je uvedeno na Obr. 3. Tyto plazmidy, reprezentované dvěma největšími plazmidy pISM1210 a pISM 1217 překrývaly 16-kb oblast (označenou jako P97 contig) odpovídající oblastem genu P97 ve směru nahoru a dolů po vlákně DNA. Mezi identifikovanými klony pomocí próby 5 byly pISM1165, pISM1168-pISM1170 a pISM1174 (Obr. 4).

Celkově bylo získáno 9374 bp sekvence DNA, včetně sekvence pro P97. Na Obr. 2 je uvedena sekvence přibližně 2750 bp, která zahrnuje gen P102. Kompletní sekvence operonu P97 byla publikována dříveji v práci autorů Hsu, T., a Minion, F.C., "Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*", 214 Gene 13-23 (1998), a Hsu et al (Přístupové č. U50901). Pomocí počítačové analýzy bylo v této 9374-bp sekvenci identifikováno celkem šest ORF (Obr. 6). P97 byl prvním genem z dvou-genového operonu, označeného jako operon P97 a vyobrazeného na Obrázcích 4 a 6. Dva geny jsou odděleny 20 bp, které zahrnují domnělou Shine Dlagarnovu sekvenci (GGAGGT 10 bp ve směru nahoru od ATG startovací kodónu druhého ORF. Tento ORF obsahoval 2712 bp s kódovací kapacitou pro protein o velikosti 102,3 kDa. Tento protein byl označen jako P102, měl vypočítané pI 9,28 a postrádal Cys (viz Tabulka 2 výše).

Protein byl vysoce hydrofilní s domnělou transmembránovou doménou v oblasti svého N-konce o velikost 25 aminokyselin (aminokyseliny 10-34). Hledání v databázi neodhalilo významnou homologii mezi P102 a jakoukoli ze známých sekvencí, včetně

jiných genů pro bakteriální adheziny. Odhad struktury P102 ukazuje na vysoký stupeň α -helicity s následující hydrofobní transmembránovou sekvencí (údaje nejsou uvedeny).

K ověření hypotézy, že v chromozómu Mhyo byly přítomny i další kopie P102, byly klonovány a analyzovány další EcoRI chromozomální fragmenty rozpoznávané P102 specifickými próbami. Pomocí restričních enzymů byly zmapovány plazmidy pISM1232-pISM1234 reprezentující 3,8-, 4,2- a 4,8-kb fragmenty. Částečná sekvenace konců 3,8 a 4,2 kb klonovaných fragmentů naznačila, že tyto dva klony pocházejí z různých chromozomálních oblastí původní P102 kopie. Přiřazení klonovaných fragmentů k P97 kontigu je uvedeno na Obr. 4. DNA sekvence 3' konce pISM1232 a 5' pISM1233 odpovídala P102 sekvenci a sekvenci ležící mezi P97 a P102, ale homologie rychle končila na 3' konci sekvence genu P97 (Obr. 4). 5' konec pISM1232 nevykazoval žádnou homologii s genem P97 a ani s žádnou jinou známou sekvencí. 3'konec pISM1233 byl homologní na proteinové úrovni s heat-shock proteinem ClpB z *Corynebacterium glutamicum* (62% identita a 84% podobnost v 98-aminokyselinové oblasti mezi aminokyselinami 158 a 256 sekvence *C. glutamicum*). Ve směru výše od sekvence clpB byl lokalizován Mhyo gen tpi pro triosafosfát izomerázu (Přístupové č. L33478). Z genomické knihovny byla získána za pomoci 400-bp próby odvozené ze sekvence P102 série překrývajících se klonů (pISM1165, pISM1168-pISM1170 a pISM1174) s podobnými restričními mapami jako u pISM1232 a pISM1233. Uspořádání těchto klonů k pISM1232 a pISM1233 je uvedeno na Obr. 4. Z těchto klonů nebyla získána žádná sekvenční informace, avšak restriční mapy ukazují, že tyto klony pocházejí ze stejné chromozomální oblasti jako pISM1232 a pISM1233.

DNA sekvenční informace získaná z plazmidu pISM1234 obsahujícího 4,8-kb hybridizující fragment prokázala krátké úseky DNA homologie s P102 roztroušenými mezi nehomologními oblastmi. Byly identifikovány dva úseky o velikosti 130 bp 82%

homologie s P102) a 177 bp (95% homologie s P102), jak je zobrazeno na Obr. 5, který vysvětluje jeho slabou reakci P102 specifickou próbou 3. Protože klony pISM1232-pISM1234 nebyly kompletně sekvenovány, je možné, že v klonovaných fragmentech jsou přítomny i jiné homologní úseky s P102, které nebyly identifikovány.

Klon pISM2166 představuje téměř kompletní homologní kopii P102. Sekvence o velikosti 1624-bp vykazuje divergenci pouze v oblasti 144-330 bp (48-110 aminokyselin), jak je vidět na Obrázcích 4 a 5. Restrikční mapa P102 je téměř kompletně identická se sekvencí operonu P97, s výjimkou absence míst SalI a AccI (Obr. 4). SalI je vzácný sestřihávající enzym v Mhyo, takže ztráta tohoto místa v kopii P102 je významná. Podle našeho závěru reprezentuje pISM2166 druhou kopii P102. Plazmidy pISM1232 a pISM1233 vykazují také dobrou shodu s P102 (Obr. 5), ale jejich restrikční mapy a sekvence ve směru nahoru od pISM1232 ukazují, že tyto fragmenty jsou odvozeny z třetího chromozomálního místa. Plazmidy pISM1232 a pISM1233 pocházejí pravděpodobně ze stejného chromozomálního místa, protože klony pISM1165, pISM1168-pISM1170 a pISM1174 překrývají oblast s identickými restričními mapami. Plazmid pISM1234 má pouze dva krátké úseky, které jsou homologní s P102, a které byly rozpoznány naší omezenou sekvenční analýzou. Avšak je jasné, že tento fragment je odvozen z jiné chromozomální oblasti.

Příklad 6

Použití proteinu 102 pro detekci přítomnosti infekce způsobené *Mycoplasma hyopneumoniae* u prasat (prospektivní příklad)

Polypeptidy mající antigenicitu *Mycoplasma hyopneumoniae*, a které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být použity v metodách a kitech navržených k detekci přítomnosti infekce způsobené *Mycoplasma hyopneumoniae* u stád prasat, a které jsou schopné rozpoznat prase ve stádě, které bylo infikováno tímto virem za účelem umožnění časně vakcinace stáda před infekcí.

Pro tyto účely mohou být například použity v RIA nebo ELISA stanoveních antigeny produkované hostitelskými buňkami transformovanými rekombinantními molekulami DNA, které jsou předmětem tohoto nádoru, nebo mohou být použity protilátky proti těmto antigenům. V jednom typu radioimunoanalýzy je protilátka proti jednomu nebo více antigenů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, vytvořena v laboratorním zvířeti (např. v králíkovi), a připojena k pevné fázi, například k vnitřnímu povrchu zkumavky. Antigen je poté přidán ke zkumavce tak, aby se vázal s protilátkou.

Vzorek prasečího séra, odebraný 1 z každých 10 až 20 prasat ze stáda, spolu se známým množstvím protilátky proti antigenu označené radioaktivním izotopem, jako je například radioaktivní jód, je přidán do zkumavky potažené komplexem antigen-protilátka. Jakákoli protilátka proti antigenu (marker Mhyo infekce) v prasečím séru bude kompetovat s označenou protilátkou o volná vazebná místa na komplexu antigen-protilátka. Jakmile dojde k reakci séra, je odstraněn nadbytek tekutiny, zkumavka je promyta a je změřeno množství radioaktivity. Pozitivní výsledek, tj., že testované prasečí sérum obsahuje Mhyo protilátku, je indikováno nízkou radioaktivitou. V jednom typu ELISA testu je mikrotitrační destička potažena jedním nebo více antigeny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, a do této destičky je přidán vzorek prasečího séra, opět od 1 z každých 10 až 20 prasat ve stádu. Po inkubaci umožňující interakci protilátky přítomné v séru s antigenem, je destička promyta a jsou přidány protilátky proti antigenu získané od laboratorního zvířete a navázané k enzymové značce. Destička je inkubována, aby došlo k reakci a destička je poté znovu promyta. Poté je k mikrotitrační destičce přidán enzymový substrát a destička je inkubována po dobu nezbytnou k umožnění reakce mezi enzymem a substrátem. Poté je změřena absorbance finálního preparátu. Velká změna absorbance značí pozitivní výsledek, tj., že testované prasečí

sérum obsahuje protilátky proti Mhyo a prase tedy bylo infikováno touto bakterií.

Příklad 7

Použití antigenů a sekvencí, které jsou předmětem tohoto vynálezu, ve vakcínách proti infekcím způsobeným *Mykoplasma hyopneumoniae* (Prospektivní příklad)

Při přípravě vakcín určených k podání prasatům, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být použity standardní metody známé v oboru. Nejlepší polypeptid může být například rozpuštěn v sterilním salinickém roztoku. Pro dlouhodobé skladování může být polypeptid lyofilizován a poté krátce před podáním rekonstituován sterilním salinickým roztokem. Před lyofilizací mohou být přidány konzervační látky a další standardní aditiva, jako jsou například látky zvyšující objem, např. glycin nebo chlorid sodný. S vakcínou může být také podána kompatibilní adjuvantní látka.

Vakcína, která je ve shodě s tímto vynálezem, může být také připravena za použití protilátek proti polypeptidům tohoto vynálezu získaných od laboratorních zvířat, jako jsou například králíci. Tato pasivní vakcína může být poté podána prasatům k ochraně před infekcí Mhyo. K začlenění sekvencí do zvířecích buněk za účelem exprese antigenu *in vivo* může být také použita přímá inkorporace sekvencí P102 DNA do hostitelských buněk.

Výše uvedený popis, vyobrazení a příklady jsou pouze ilustrací přednostních forem vynálezu, které ukazují na předmět, rysy a výhody předkládaného vynálezu. Není zamýšleno, aby byl předkládaný vynález omezen na popsané formy vynálezu. Jakákoli modifikace předkládaného vynálezu, která je ve shodě s duchem a v rozsahu následujících patentových nároků, by měla být považována za součást předkládaného vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

Nárokovány jako nové a požadovány, aby byly chráněny patentem Spojených států jsou následující patentové nároky:

1. Protein obsahující alespoň část aminokyselinové sekvence P102, jak je uvedena na Obrázku 1, a mající antigenicitu proteinu P102 nativního *M. hyopneumoniae*.
2. Protein definovaný v patentovém nároku 1, v kterém řečený protein obsahuje celou aminokyselinovou sekvenci proteinu P102, jak je uvedena na Obrázku 1.
3. DNA kódující protein definovaný v patentovém nároku 1, kde řečená DNA je rekombinantní nebo syntetická DNA.
4. DNA definovaná v patentovém nároku 3, kde řečená DNA je operativně připojena k alespoň jedné kontrolní sekvenci kompatibilní s vhodnou bakteriální hostitelskou buňkou.
5. Bakteriální hostitelská buňka transformovaná pomocí DNA definované v patentovém nároku 3, která je operativně připojena k alespoň jedné kontrolní sekvenci kompatibilní s řečenou bakteriální hostitelskou buňkou, kde řečená bakteriální hostitelská buňka je schopná exprimovat protein kódovaný řečenou DNA v detekovatelném množství.
6. Vakcína určená k ochraně vnímavého živočicha před enzootickou pneumonií způsobenou *M. hyopneumoniae* a obsahující imunogenní protein mající antigenicitu nativního proteinu P102 a dále vhodný nosič pro řečený imunogenní protein.
7. Vakcína definovaná v patentovém nároku 6, kde řečený imunogenní protein má aminokyselinovou sekvenci zobrazenou na Obrázku 1.
8. Vakcína definovaná v patentovém nároku 6, kde řečený imunogenní protein je kódován sekvencí DNA zobrazenou na Obrázku 2.
9. Vakcína definovaná v patentovém nároku 6, kde řečený imunogenní protein má aminokyselinovou sekvenci obsahující alespoň část aminokyselinové sekvence zobrazené na Obrázku 1.

10. Vakcína definovaná v patentovém nároku 6, kde řečený imunogenní protein je kódován sekvencí DNA obsahující alespoň část sekvence DNA zobrazené na Obrázku 2.
11. Vakcína definovaná v patentovém nároku 6, kde řečeným zvířetem je prase.
12. DNA určená pro expresi polypeptidového produktu majícího antigenicitu přirozeně se vyskytujícího P102 v prokaryotické a eukaryotické hostitelské buňce.
13. DNA definovaná v patentovém nároku 12, kde řečená DNA je vybraná ze skupiny tvořené DNA z Obrázků 2, 3, komplementárním řetězcem DNA z Obrázku 2 a komplementárními řetězci DNA z Obrázku 3.
14. DNA definovaná v patentovém nároku 12, kde řečená DNA je hybridizována s DNA vybranou ze skupiny tvořené DNA z Obrázků 2, 3, komplementárním řetězcem DNA z Obrázku 2 a komplementárními řetězci DNA z Obrázku 3.
15. Způsob ochrany zvířat před enzootickou pneumonií způsobenou *M. hyopneumoniae*, která zahrnuje podání vakcíny obsahující aktivní složku zvířeti, kterážto aktivní složka je vybraná ze skupiny tvořené proteinem vyvolávajícím tvorbu protilátek, které rozpoznávají antigen P102 *M. hyopneumoniae*, a dále DNA kódující polypeptid vyvolávající tvorbu protilátek, které rozpoznávají antigen P102 *M. hyopneumoniae*; řečená vakcína s řečenou aktivní složkou je podávána v množství účinném pro ochranu před enzootickou pneumonií způsobenou *M. hyopneumoniae*.
16. Způsob definovaný v patentovém nároku 15, kde řečený protein je protein P102 *M. hyopneumoniae*.
17. Způsob definovaný v patentovém nároku 16, kde řečený protein P102 *M. hyopneumoniae* je rekombinantního původu.
18. Způsob definovaný v patentovém nároku 16, kde řečený protein P102 *M. hyopneumoniae* je kódován DNA sekvencí uvedenou na Obrázku 2.
19. Způsob definovaný v patentovém nároku 16, kde řečený protein P102 *M. hyopneumoniae* je kódován DNA sekvencí, která

- kóduje alespoň část proteinu mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou na Obrázku 1.
20. Způsob definovaný v patentovém nároku 15, kde řečená DNA obsahuje alespoň část sekvence DNA uvedené na Obrázku 2.
21. Způsob detekce přítomnosti protilátek proti proteinu P102 v testovaném vzorku zahrnující zajištění testovaného vzorku, který je podezřelý, že obsahuje protilátky P102, dále přidání množství proteinu P102 nebo jeho antigenního fragmentu k testovanému vzorku, přičemž toto množství je dostatečné, aby došlo k vytvoření detekovatelné hladiny enzymové aktivity pomocí protilátek proti proteinu P102 v testovaném vzorku, a konečně zahrnující provedení stanovení proteinu za účelem detekce přítomnosti protilátek proti proteinu P102 v testovaném vzorku.
22. Diagnostický kit určený k detekci přítomnosti protilátek proti proteinu P102 v testovaném vzorku, který obsahuje nosič s alespoň jednou nádobkou, kde řečená alespoň jedna nádobka obsahuje značený antigen p102.

180700

Photo - 1958

5769A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| M | K | L | A | * | L | L | K | K | * | F | W | L | I | * | T | T | I | A | G | I | 20 |
| S | L | S | L | S | A | A | S | G | P | V | V | G | I | T | N | S | Y | N | K | S | 40 |
| Y | Y | S | Y | L | N | Q | I | V | S | Q | L | K | V | A | K | N | A | K | I | K | 60 |
| S | Q | E | K | F | D | S | I | V | L | N | L | K | I | K | D | N | F | K | K | K | 80 |
| W | S | A | K | T | V | L | T | A | A | K | S | D | L | Y | R | Y | N | L | V | L | 100 |
| S | A | F | D | L | S | E | L | I | N | N | D | Y | L | V | S | F | D | L | E | L | 120 |
| N | A | V | V | D | Q | N | S | I | K | N | V | V | I | Y | A | K | S | D | K | A | 140 |
| D | Q | I | T | Y | S | K | Q | I | V | L | K | G | F | G | N | T | E | Q | A | R | 160 |
| R | T | N | F | D | F | S | Q | I | D | S | S | K | S | F | V | D | L | S | R | R | 180 |
| A | N | L | T | L | M | E | F | Q | I | L | L | A | Q | N | F | E | N | E | R | R | 200 |
| G | S | N | W | F | S | R | L | E | R | A | L | V | A | S | K | A | S | L | S | S | 220 |
| L | Y | N | S | L | G | E | P | V | F | L | G | P | D | Y | Q | L | D | P | V | V | 240 |
| L | D | R | K | K | L | L | T | L | L | N | K | D | G | K | L | V | L | G | L | L | 260 |
| N | L | V | Q | I | S | T | K | K | T | M | N | L | N | L | E | V | R | G | A | A | 280 |
| I | S | N | Q | E | I | S | K | I | L | K | S | W | L | E | T | N | L | Q | G | G | 300 |
| K | L | K | T | K | D | L | Q | M | A | L | V | K | D | K | I | S | L | S | S | S | 320 |
| D | Y | W | Y | G | S | P | N | S | K | V | N | T | S | Q | I | L | T | K | S | S | 340 |
| K | E | F | K | D | L | F | D | L | S | E | T | N | F | F | L | N | T | K | I | I | 360 |
| G | T | V | Y | L | S | I | I | P | K | L | L | D | P | S | Q | I | S | V | V | V | 380 |
| D | K | K | K | L | V | E | N | Q | K | I | R | F | E | I | T | A | S | L | K | K | 400 |
| R | K | A | I | D | K | K | F | I | I | Q | D | L | P | V | F | V | D | L | K | K | 420 |
| V | D | F | N | K | Y | Q | A | A | V | A | Q | M | F | G | T | I | K | A | V | V | 440 |
| K | E | F | S | M | P | E | D | Q | D | A | K | T | L | S | S | N | E | I | K | K | 460 |
| Q | R | V | D | R | L | F | E | L | A | K | T | V | T | N | L | E | N | P | S | S | 480 |
| E | E | V | L | K | S | J | Y | L | L | N | T | G | K | Y | L | V | D | Q | D | D | 500 |
| Q | E | K | V | K | Q | E | L | K | T | V | I | E | G | L | K | S | K | A | N | N | 520 |
| T | Q | K | T | E | K | N | S | P | T | Q | P | K | K | P | E | V | S | L | A | A | 540 |
| K | T | T | E | N | S | A | K | T | V | K | V | S | T | F | A | E | E | A | K | K | 560 |
| G | Q | S | Q | S | Q | Q | T | Q | P | V | S | T | S | S | P | Q | T | S | Q | Q | 580 |
| N | S | L | P | N | S | T | S | S | S | N | S | V | L | E | N | E | K | F | G | G | 600 |
| T | S | I | W | T | A | F | N | F | A | N | I | Y | N | L | E | N | T | K | S | S | 620 |
| E | Y | E | I | S | T | L | G | N | K | L | F | F | D | F | K | L | V | D | K | K | 640 |
| T | N | Q | N | L | I | L | A | Q | S | K | I | S | L | N | N | I | I | N | S | S | 660 |
| N | K | S | A | Y | D | I | I | K | K | F | N | P | D | V | F | L | D | G | T | T | 680 |
| I | N | Y | Q | N | Q | G | K | D | K | K | E | F | I | L | K | D | L | S | D | D | 700 |
| N | K | L | I | F | K | S | E | D | A | I | Q | T | D | Q | G | L | E | L | K | L | 720 |
| K | P | L | K | L | Q | S | K | S | S | N | P | E | K | E | I | S | T | S | L | L | 740 |
| Y | T | G | A | I | Y | L | V | F | D | A | K | N | I | S | D | G | N | W | I | N | 760 |
| N | L | L | A | D | R | K | E | I | V | E | N | G | T | Y | L | Y | E | I | L | A | 780 |
| N | V | P | K | T | K | E | V | N | S | Y | F | F | T | K | Y | P | K | R | V | V | 800 |
| G | K | D | S | I | K | E | V | I | N | P | K | D | T | P | N | F | F | T | L | E | 820 |
| K | R | L | K | F | E | I | N | P | K | D | T | P | N | F | F | T | L | E | Q | S | 840 |
| W | F | H | L | D | W | P | T | I | I | K | R | S | E | L | I | N | G | L | R | N | 860 |
| N | A | K | K | E | G | S | L | T | K | R | S | E | L | I | N | G | L | R | N | N | 880 |
| F | A | E | K | K | G | S | L | T | K | R | S | E | L | I | N | G | L | R | N | N | 900 |
| Y | V | K | K | K | S | L | T | K | R | S | E | L | I | N | G | L | R | N | N | N | 904 |

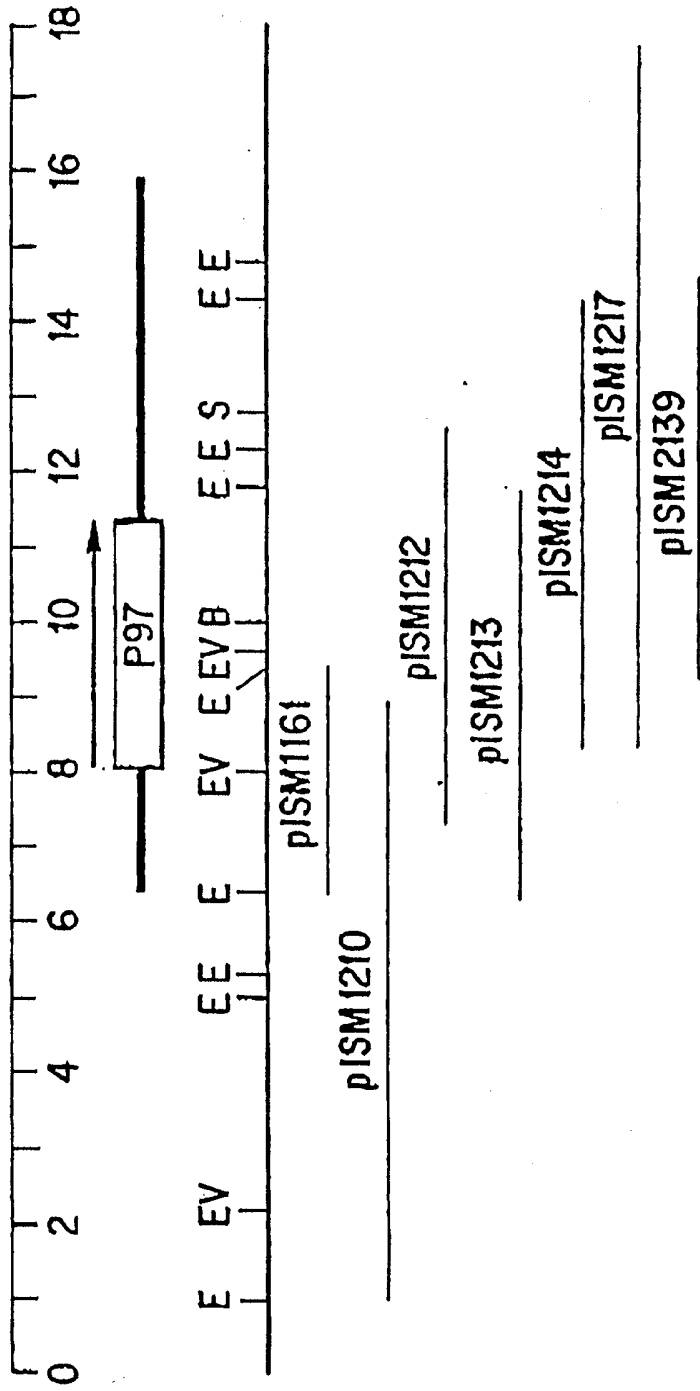
19.07.00

* * * * *

ATAAAACCCGGAGGTATTTATCCTATGAAGTTAGCAAAATTACTTAAAAAACCTTTTGGATT
 AATAACAACAATTGCCGGAATTAGTCTTAGTTTATCAGCCGCTGTTGGTACAGTTGTCGGAA
 TTAATTCCTTATAATAAATCATATTATCTTATCTAAATCAGATCCCGAGTCAGCTAAAAGTA
 GCAAAAAATGCTAAAATTAGTCAGGAAAAATTTGATTCAATTGTTTTAAATCTTAAAATTA
 AGATAATTTTAAAAAATGATCGGCAAAAACAGTTTTAACTGCTGCCAAAAGTGATCTTTATC
 GTTATAATCTTGTTCTGCTTTTGATTTAAGTGAACATAAAACAATGATTATTTAGTAAGT
 TTTGATCTTGAAAATGCAGTAGTTGATCAAAATTC AATTAAAAATGTTGTTATTTATGCAA
 ATCTGATAAGGATCAATAACTTATTCAAAACAAATTGTACTTAAAGGCTTTGGAAATACAG
 AACAAGCTAGAACTAATTTTGATTTTAGTCAAATTTGATTCAAGCAAGTCTTTTGTTGATCTT
 TCAAGAGCAAATCTAATTTGATGGAATTC A AATTTTGCTTGCCAAAATTTTGAAAATGA
 AAGAGGAAGTAATTGATTTTACGACTTGAAAAGAGCTTTGGTTGCATCAAAAGCGAGTCTTT
 CACTTTATAATTCCTTAGGAGAACCCGATTTTTAGGCCAGATTATCAATTAGACCCAGTT
 TTGGACCGAAAAAATTATTAAC TTTGTTAAATAAAGATGGAAAATTAGTTCTTGGACTTAA
 TTTAGTGCAAATTTCAACTAAAAAACTATGAATTTAAATCTTGAAGTTCGCGGCGCGATTT
 CAAATCAGGAAATTTCTAAAATTC A AATCCTGACTTGAAACAAATCTTCAAGGCAAATTA
 AAAACCAAAGATGATTTGCAAATGGCACTAGTAAAAGATAAAATTAGCCTCTGATTATTG
 ATATGGATCTCCGAATTC AAAAGTAAATACATCCCAAATTTTAAACAAAAGTAAAGAATTTA
 AAGATCTTTTGTATTTAAGTGAGACAAATTTTTCTTAATACCAAATCGGAACTGTCTAT
 TTAAGTATTATCCCAAAC TTTAGATCCAAGTCAGATTTCTGTTGTTGATAAGAAAAAACT
 AGTTGAAAATCAAAAAATTCGCTTTGAAATTA CTGCTTCTTTAAAACGAAAAGCTATTGATA
 AAAATTTATCATCCAGGATCTTCCAGTTTTTGTTGATCTAAAAGTTGATTTTAAATAATAC
 CAAGCCGCTGTTGCCCAAATGTTTGGAACGATAAAAAGCAGTTAAGAATTTTCAATGCCTGA
 AGATCAAGATGCAAAAAC TTTATCCTCAAATGAAATAAAACAGCGAGTTGATCGACTTTTTG
 AACTAGCAAAAACAGTGACTAATTTGGAAAATCCAAGTGAAGAAGTTCTTAAAAGCATTAT
 TTATTAATAACGGGAAAATATTTAGTCGACCAAGACCAGGAAAAAGTAAAACAAGAGCTAAA
 AACCGTGATTGAGGGCTTAAAATCAAAGGCAAATACTCAAAAAACAGAAAAAATAGCCCCA
 CACAACCGAAAAACAGAGGTTTCACTAGCTAAAACAACAGAAAATTCAGCAAAAACAGTC
 AAGGTAAGCACTTTTGCAGAAGAAGCTAAGGGTCAAAGTCAAAGTCAGCAACACAACCAAGT
 TTCCACTTCATCGCCTCAAAC TAGTCAAATTCACTTCTAATTCACAAGCAGCTCAAAT
 CTGTATTAGAAAATGAAAAATTTGGGACAAGCATTG AACAGCTTTTAATTCGCTAATATT
 TATAATCTTGAAAATACAAAAGCGAATATGAGATCTCAACTTTAGGAAATAAGCTATTTTT
 TGATTTTAAATTAGTTGATAAAACTAATCAAATCTAATTTTGGCTCAGTCCAAAATTAGTC
 TTAATAATATTATTAATTC AATAAATCTGCCTATGATATAATTAAGAAATTC AATCCCGAT
 GTGTTTTTAGATGGAACAATTAATTATCAAATCAAGGAAAAGATAAAAAAGAATTTATCCT
 AAAAGATTTAAGTGATAATAAATTAATTTTAAATCAGAAGATGCAATTC AACTGATCAAG
 GTTTAGAGCTAAAGAAAC TTTGAAATTACAGTCAAATCGTCTAATCCAGAAAAAGAAATA
 TCAACTTCTTATATACCGGAGCAATTTATTTAGTTTTTGATGCAAAAAATTTTCCGATGG
 TAATTGGATTAATCTTTTAGCCGATAGAAAAGGAAAAGGGCTTGAATTAAGTTCAA AAT
 CAAATAATAATGTACCTAAAACCAAAGAAATTTGTTGAGAATGGTACCTATTTATATGAAAT
 CTTGCTGGCAAGGATTCGATTAAGGTAAATTC TATTTTTTTTCCAACAAAGTACCCAAAACG
 TGTA AACGTCTTAAATTCGAGATTAACCCTAAGACACCTTGCCAAAATTTCTTTACTTTAG
 AATGATTTTCATCTTGATTGGTATCAAATCGGCCAGGCGAACAAAATAAAAAACCACAACAA
 AACGCTAAAAAAGAACCTACAATTATATAAAAACGCTGGCAATTTTAAATGATAAATCATT
 TGCAGAGAAAGGAAGTTTAAACAAAAGAAGTGAATTAATTAACGGGTTGATTAGAAACTATG
 TAAAAAGTAAACGATCAAATTTTTGTTAAAAA

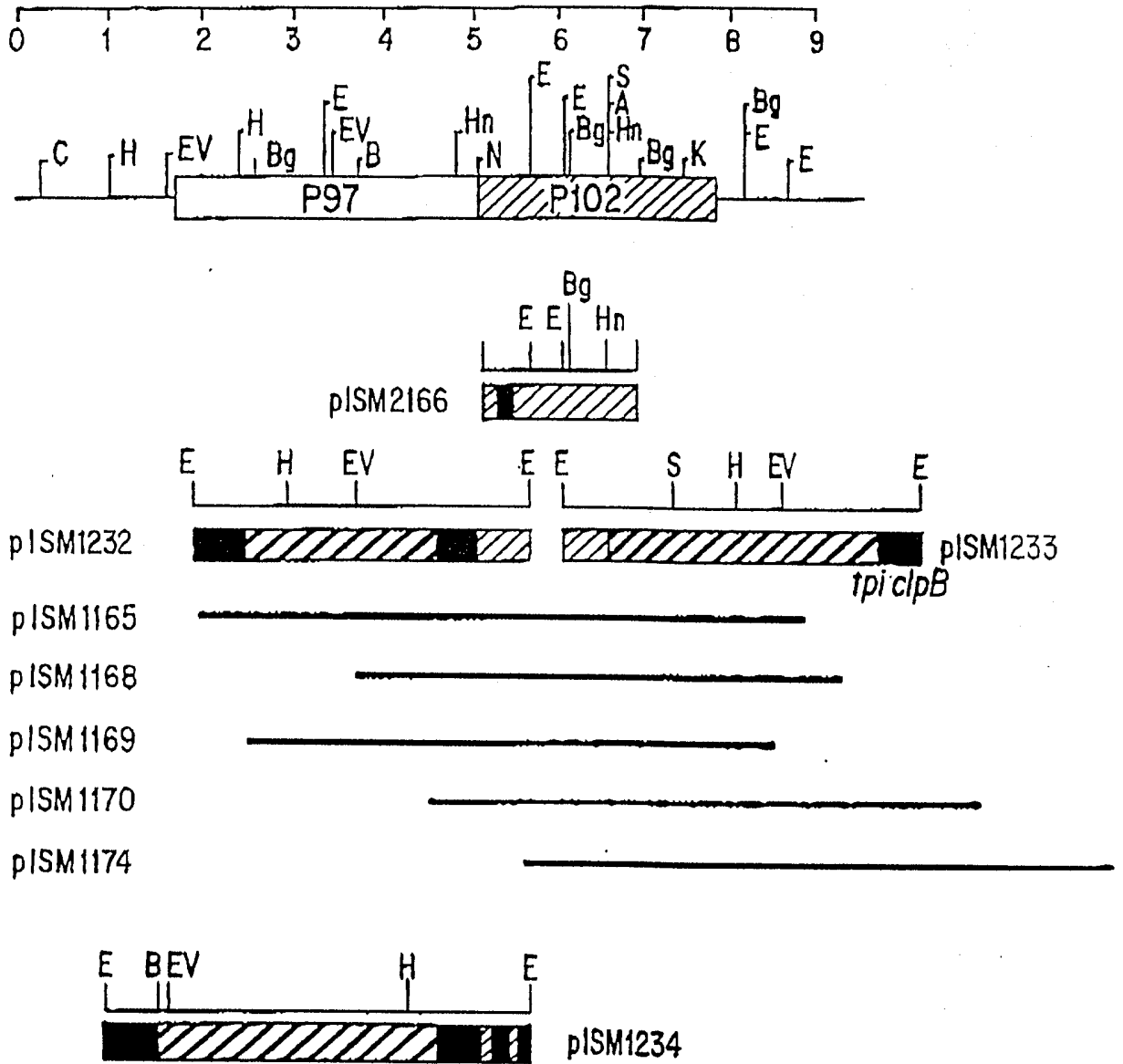
08.07.00

3/8

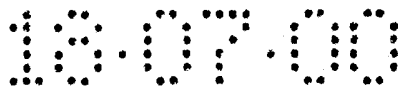


Obr. 3

4/8



Obr. 4



PI02 MKLAKLLKPPFWLITTIAGISLSLSA AVGT VVGINSYNKSYYSYLNQIPSS
 1232/3 MKLAKLLKPPFWLITTIAGISLSLSA AVGT VVGINSYNKSYYSYLNQIPSS
 2166 MKLAKLLKPPFWLITTIAGISLSLSA AVGT VVGINSYNKSYYSYLNENPPS
 1234 MKLAKLLKPPFWLITTIAGISLSLSA AVGT VVGINSYNKSYYSYLNENPPS

PI02 QLKVAKNAKISQEKFD SIVLN LKIKDNFKKWSAKTIVLTA AKS DLYRYNLV
 1232/3 QLKVAKNAKISQEKFD SIVLN LKIKDNFKKWSAKTIVLTA AKS DLYRYNLV
 2166 QLKTTKTTKISQQDQDKIVSNLKI RDNFKKWSAKTIVLTA AKS DLYRYNLV
 1234 QLKTTKTTKISQQDQDKIVSNLKI RDNFKKWSAKTIVLTA AKS DLYRYNLV

PI02 SAFDLSELJNNDYLV SFDL ENAVVDQNSIKNVVIYAKSDKDKDQITYSKQIV
 1232/3 SAFDLSELJNNDYLV SFDL ENAVVDQNSIKNVVIYAKSDKDKDQITYSKQIV
 2166 RAFFESSELETTNNYQISFDLENAVVDQNSIKNVVIYAKSDKDKDQITYSKQIV
 1234 RAFFESSELETTNNYQISFDLENAVVDQNSIKNVLVFAKSEKDKDQITYSKQIE

PI02 LKGFGNTEQARTNFDFSQIDSSKSFVDSL SRANLTLMEFQI LLAQNFFENER
 1232/3 LKGFGNTEQARTNFDFSQIDSSKSFVDSL SRANLTLMEFQI LLAQNFFENER
 2166 LKGFGNTEQARTNFDFSQIDSSKSFVDSL SRANLTLMEFQI LLAQNFFENER
 1234 LKGFQAQDDEAAGDLVKFQIDQRKSFVNLKYKFDYSFS EFQRI

PI02 GSNWFSRLERALVASKASLSLYNSLGE PVFLGPDYQLDPVLD RKKLLTLL
 1232/3 GSNWFSRLERALVASKASLSLYNSLGE PVFLGPDYQLDPVLD RKKLLTLL
 2166 GSNWFSRLERALVASKASLSLYNSLGE PVFLGPDYQLDPVLD RKKLLTLL

6/8

8000

Obv. 5B

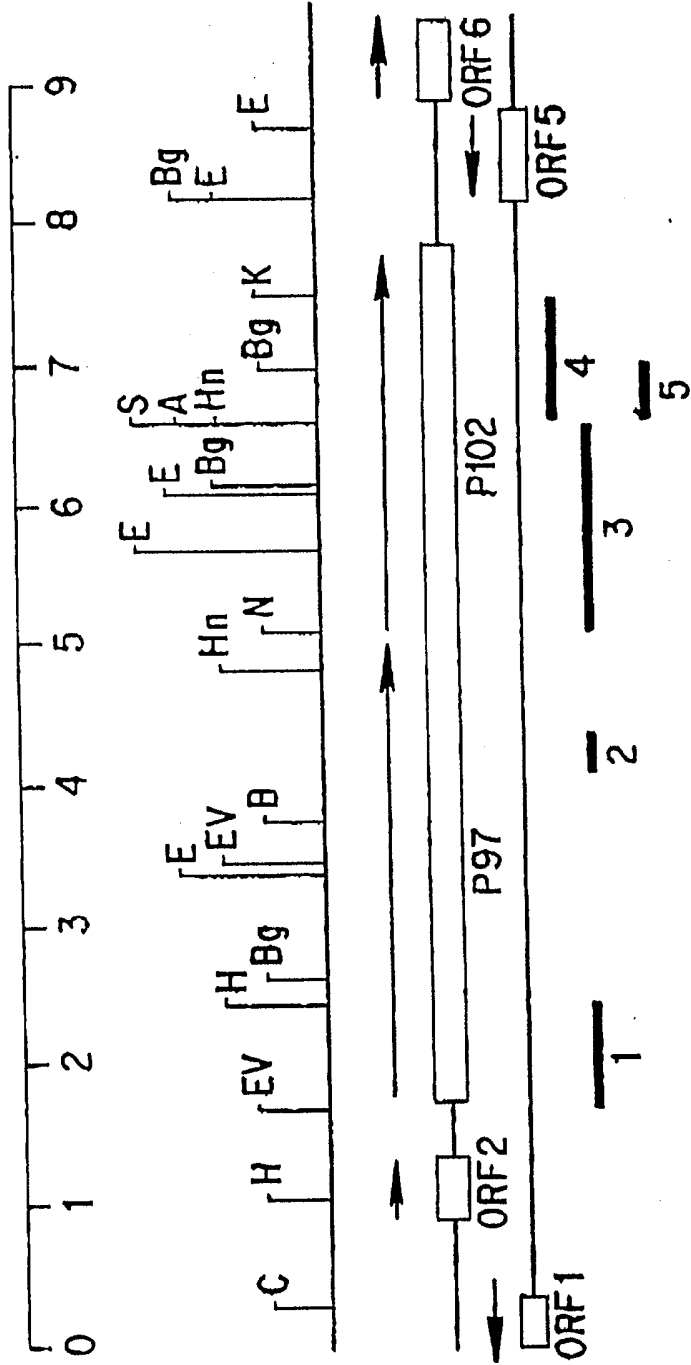
PI02 NKD G X L V L G L N L V Q I S T K K T M N L N L E V R G A I S N Q E I S K I L K S W L E T N L Q Q
 1232/3
 2166 NKD G X L V L G L N L V Q I S T K K T M N L N L E V R G A I S N Q E I S K I L K S W L E T N L Q Q

PI02 X L K T K D D L Q M A L V K D K I S L S D Y W Y G S P N S K V N T S Q I L T K S K E F K D L F D L S
 1232/3
 2166 X L K T K D D L Q M A L V K D K I S L S D Y W Y G S P N S K V N T S Q I L T K S K E F K D L F D L S

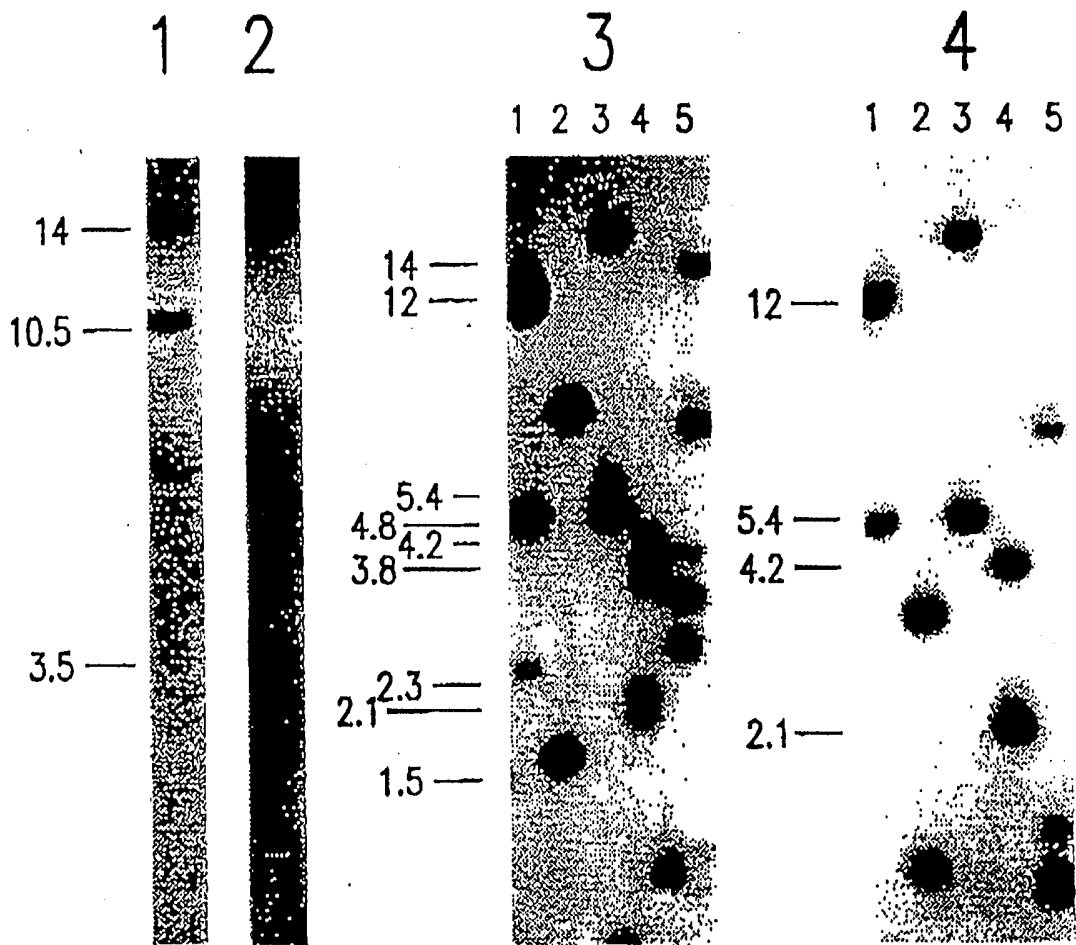
PI02 E T N F F L N T K I G T V Y L S I I P K L L D P S Q I S V V D X K K L V E N Q K I R F E I T A S L K
 1232/3
 2166 E T N F F L N T K I G T V Y L S I I P K L L D P S Q I S V V D X K K L V E N Q K I R F E I T A S L K

PI02 R K A I D K K F I I Q D L P V F V D L K V D F N K Y Q A A V A Q M F G T I K A V K E F S M P E D Q D
 1232/3
 2166 R K A I D K K F I I Q D L P V F V D L K V D F N K Y Q A A V A Q M F G T I K A V K E F S M P E D Q D

PI02 A K T L S S N E I K Q R V D R L F E L A K T V T N L E N P S E E V L K S I Y L L N T G K Y L V D Q D
 1232/3
 2166 A K T L S S N E I K Q R V D R L F E L A K T V T N L E N P S E E V L K S I Y L L N T G K Y L V D Q D



Obt. 6



Obr. 7