

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-392
(22) Přihlášeno: 19.06.2019
(40) Zveřejněno: 07.10.2020
(Věstník č. 41/2020)
(47) Uděleno: 26.08.2020
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 07.10.2020
(Věstník č. 41/2020)

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
KOSLOVÁ A. et al.: „Genetic resistance to avian leukosis viruses induced by CRISPR/Cas9 editing of specific receptor genes in chicken cells,“ Viruses, vol. 10, no. 11, 2018, str. 605, ISSN 1999-4915; LEE H. J. et al.: „Precise gene editing of chicken Na⁺/H⁺ exchange type 1 (chNHE1) confers resistance to avian leukosis virus subgroup J (ALV-J),“ Developmental and Comparative Immunology, vol. 77, 2017, str. 340 – 349, ISSN 0145-305X; LEE H. J. et al.: „Sequential disruption of ALV host receptor genes reveals no sharing of receptors between ALV subgroups A, B and J,“ Journal of animal Science and Biotechnology, vol. 10, no. 23, 2.4.2019, ISSN 2049-1891, CZ 307102; CZ 307285.

(73) Majitel patentu:
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha 4,
Krč, CZ
BIOPHARM, Výzkumný ústav biofarmacie a
veterinárních léčiv a.s., Pohoří, CZ

(72) Původce:
RNDr. Jiří Hejnar, CSc., Otročiněves, CZ
Ing. Pavel Trefil, DrSc., Praha 10, Uhřetíněves, CZ
Ing. Anna Koslová, Ph.D., Praha 5, Stodůlky, CZ
RNDr. Jitka Mucksová, Ph.D., Okrouhlo, CZ
Ing. Jiří Plachý, CSc., Praha 4, Michle, CZ
Mgr. Jiří Kalina, Ph.D., Benešov, CZ
RNDr. Markéta Reinišová, Praha 6, Dejvice, CZ
Ing. Dana Kučerová, Praha 7, Holešovice, CZ

(74) Zástupce:
Patentová kancelář VYNÁLEZY.cz, Mgr. Hana
JIRKALOVÁ, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4,
Michle

(54) Název vynálezu:
**Způsob přípravy geneticky upravené
drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému
viru podskupiny J**

(57) Anotace:
Řešení se týká způsobu přípravy geneticky upravené
drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému viru
podskupiny J, které je charakterizováno tím, že tato
drůbež nese delecí W38 zavedenou do genu chNHE1
pomocí homologní rekombinace mediované
CRISPR/Cas9, případně že nese delecí W38 zavedenou
pomocí CRISPR/Cas9 a specifickou sgRNA, za vzniku
kura domácího nebo krocana domácího rezistentního vůči
ptačímu leukóзовému viru ALV podskupiny J.

Způsob přípravy geneticky upravené drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému viru podskupiny J

5 Oblast techniky

Řešení se týká uměle vytvořené, trvalé a geneticky podmíněné rezistence vůči závažnému drůbežimu onemocnění - ptačí leukóze, vyvolané virem ALV podskupiny J.

10

Dosavadní stav techniky

Aviární leukóza je neoplastické onemocnění hematopoetického systému drůbeže vyvolávané ptačími leukóзовými viry.

15

Původcem aviární leukózy jsou ptačí leukóзовé viry (ALV) z čeledi *Retroviridae*, nejčastěji z podskupin A a B, nověji J a zcela recentně K. Infekce exogenními ALV se v populaci drůbeže zjišťují velmi často (Jurajda, V., 2002), ale incidence klinického onemocnění je obecně mnohem nižší (1 až 5 % z infikovaných), než např. u Markovy nemoci. Z leukóзовých forem se relativně nejčastěji vyskytuje lymfoidní leukóza (LL); ostatní patologické projevy ALV včetně osteopetrózy, sarkomů a jim příbuzných nádorů, se vyskytují v terénu sporadicky až vzácně. Výjimku tvoří myelocytomatóza, vyvolávaná ALV z podskupiny J, která se v 90. letech začala vyskytovat v rozmnožovacích chovech masného typu (RCHM) a u výkrmových kuřat v mnoha zemích světa, včetně České republiky. Ekonomická závažnost ALV typu J spočívá nejen v přímých ztrátách úhynem, ale zejména v negativním vlivu na užitkovost chovů (nižší hmotnostní přírůstky a snáška). Navíc imunosupresivní účinek latentních infekcí virem lymfoidní leukózy zhoršuje průběh jiných infekcí.

20

25

V případě infekce drůbeže ALV-J virus vstupuje do buněk přes receptor chNHE1. Tento retrovirus se pomocí reverzní transkripce přepisuje a integruje se jako provirus do jaderné DNA hostitelské buňky. Z provirové DNA se přepisuje virová RNA, která se v cytoplasmě translatuje a balí do nově vznikajících částic. Uvolňováním částic z infikované buňky dochází k šíření infekce do permissivních buněk v těle jedince, pokud drůbež není nějakým způsobem rezistentní nebo chráněna restričními faktory.

30

35

V životním cyklu retrovirů rozhoduje o citlivosti nebo rezistenci k viru přítomnost vhodné receptorové molekuly na povrchu cílové buňky. Receptor chNHE1 je buněčný glykoprotein s iontově výměňovou funkcí, který se vyskytuje jako homotrimer. Jeho prominentní první extracelulární smyčka obsahuje aminokyselinové zbytky kritické pro interakci s ALV-J. Kuřecí buňky zbavené tohoto glykoproteinu nejsou permissivní pro infekci ALV-J. Stejně tak delece jediné aminokyseliny, W38, má za následek rezistenci k ALV-J, nikoli ovšem ostatních podskupin ALV. Delece nebo substituce W38 byly nalezeny v NHE1 bažantů a většiny hrabavých ptáků, citlivými druhy jsou tak jen kur domácí, čtyři druhy divokých kuřů, krocan a několik druhů amerických křepelů z rodů *Calipepla*, *Colinus* a *Oreortyx* (Plachý J, Reinišová M, Kučerová D, Šenigl F, Stepanets V, Hron T, Trejbalová K, Elleder D, Hejnar J.: Identification of New World quails susceptible to infection with avian leukosis virus subgroup J. *Journal of Virology* 91(3): e02002-16, 2017). Podle našeho výzkumu se v chovech domácích slepic ani v primitivních plemenech kura domácího nevyskytují alely s delecí W38. Proto nelze využít přirozených zdrojů variability pro plemenitbu směrem k rezistenci (Reinišová M, Plachý J, Kučerová D, Šenigl F, Vinkler M, Hejnar J.: Genetic Diversity of NHE1, Receptor for Subgroup J Avian Leukosis Virus, in *Domestic Chicken and Wild Anseriform Species*. *PloS One* 11(3):e0150589).

40

45

50

V drůbežářsky vyspělých státech je systematickou a dlouhodobou selekcí zvířat s tímto onemocněním dosahováno eradikace (např. poslední ohnisko infekce ALV-J ve Spojených státech

bylo likvidováno v r. 2007 (Malhotra S, Justice J 4th, Lee N, Li Y, Zavala G, Ruano M, Morgan R, Beemon K: Complete genome sequence of an american avian leukosis virus subgroup j isolate that causes hemangiomas and myeloid leukemia. Genome Announcements 3(2): pii: e01586-14, 2015). Jedná se ale o poměrně náročný a nákladný screening zvířat ve šlechtitelské procesu, který je možný jen ve velkochovech pod plnou kontrolou proti infekčním onemocněním. V Číně a v podstatě celé Asii a Africe, kde je naprosto normální trhový prodej drůbeže jakéhokoliv stáří a kde probíhá výkrm i v malých rodinných farmách bez jakékoliv kontroly, je zatím nereálné se této virové choroby drůbeže zbavit i přes eradikační programy v posledních letech.

Podstata vynálezu

Výše uvedené problémy odstraňuje způsob přípravy geneticky upravené drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému viru podskupiny J, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že tato drůbež nese delecí W38 zavedenou do genu chNHE1 pomocí homologní rekombinace mediované CRISPR/Cas9, případně že nese delecí W38 zavedenou pomocí CRISPR/Cas9 a specifickou sgRNA, za vzniku rezistentního kura domácího nebo krocana domácího vůči ptačímu leukóзовému viru ALV typu J.

Původci vynálezu byli vytvořeni geneticky upravení drůbeží jedinci, u kterých byl pomocí genomové editace primordiálních gonocytů (PGC) deletován kodon pro tryptofan v poloze 38 (W38) v genu pro iontový výměník chNHE1. Protože chNHE1 slouží jako receptor pro ALV-J a W38, je aminokyselina kritická pro jeho receptorovou, ale nikoli výměňkovou funkci, výsledkem navození plné rezistence vůči ALV-J. Řešení vychází ze dvou již udělených českých patentů č. 307102 a č. 307285.

Podle českého patentu č. 307102 je nám známo, že ke konstrukci transgenních jedinců je možné použít drůbeží embryonální buňky, tzv. primordiální gonocyty (PGC), které mohou být *in vitro* kultivovány, geneticky upraveny a posléze transplantovány do varlat kohoutů sterilizovaných ozářením. Z vnesených buněk dojde k obnově spermiogeneze a lze tak dospět k potomkům, kteří ponese genetickou modifikaci identickou s transplantovanými PGC. Podle českého patentu č. 307285 je nám známo, že delecí aminokyseliny W38 v receptoru chNHE1 způsobí plnou rezistenci proti ptačí leukóze, a to v *in vitro* modelu na kuřecích fibroblastech.

Způsob podle vynálezu je ve své podstatě sloučením výsledků těchto dvou již uvedených českých patentů, kdy vznikne geneticky upravená linie kura domácího s delecí W38. Díky znemožnění vstupu leukóзовým virům do buňky takových jedinců se navodí trvalá rezistence. Tato ochrana je u těchto kuřat geneticky podmíněná, a tudíž přenosná do dalších generací. Zahnutí takto rezistentních modifikovaných jedinců do šlechtitelského programu mohou danou vlastnost získat všichni jedinci, čímž se výrazně zvýší kvalita chovného hejna a ve svém důsledku dojde k výrazné ekonomické úspoře v produkci vajec, popř. drůbežího masa. Tento nový způsob může mít celosvětový dopad na zdraví drůbeže a je platný zejména pro kura domácího a krocana domácího (souhrnně uváděno jako drůbež).

Způsob podle vynálezu týkající se aviární leukózy typu J řeší původci vytvořený model geneticky upravených jedinců s trvalou rezistencí vůči infekci ALV-J. Představuje tak cestu k eradikaci této choroby nejen v Číně a jihovýchodní Asii, ale i v dalších částech světa, protože existuje riziko znovu zavlečení nových a hůře eradikovatelných čínských kmenů ALV-J do oblastí, kde se toto onemocnění v současnosti nevyskytuje, včetně Evropy a Spojených států.

Jak už bylo uvedeno, český patent č. 307285 se zejména týká senzitivity a rezistence k infekci ALV-J u kura domácího. Zakládá nárok na izolovanou molekulu DNA kódující mutovaný protein chNHE1, nebo jeho fragment, kde tryptofan v poloze 38 byl/je deletován a dále izolované molekuly DNA kódující mutovaný protein chNHE1, nebo jeho fragment, kde tryptofan v poloze 38 je

nahrazen glycinem, popř. glutamátem. V tomto patentu bylo experimentálně na buňkách ověřeno, že sekvence NHE1 kura domácího obsahující W 38 mutantu poskytuje úplnou rezistenci k infekci ALV-J! V tomto patentu se přišlo na skutečnost, že je-li v receptoru chNHE1 nahrazen tryptofan za glycin, tato substituce způsobí plnou rezistenci proti ptačí leukóze a to v *in vitro* modelu na kuřecích fibroblastech. Tato skutečnost se pak mohla potvrdit/vyvrátit pouze vytvořením transgenní drůbeže, kde je tato delece nebo substituce zavedena do genomu editací pomocí CRISPR/Cas9. K tomuto účelu slouží nově vytvořený model tvorby transgenních zvířat podle českého patentu č. 307102, který se přímo týká způsobu produkce ptačích oplození schopných spermií vyvinutých ve varleti sterilizovaného kohouta příjemce, po transplantaci donorových primordiálních zárodečných buněk drůbeže, umožňující naprosto reálnou a praktickou tvorbu transgenních jedinců s cca 50% vysokou účinností.

Objasnění výkresů

Na přiložených výkresech je na obr. 1 znázorněno schéma homologní rekombinace vedoucí k deleci W38 v kuřecím genu pro NHE1. Zcela nahoře intron-exonová struktura genu chNHE1. V 1. exonu je cílová oblast pro gRNA (uprostřed) s vyznačením kodonu TGG pro W38 (žlutě) jako štěpným místem pro nukleázu Cas9 (nužky). Červeně jsou vyznačeny nukleotidy, jejichž synonymní mutací se vytváří rozpoznávací místo pro endonukleázu BsaI, která poté slouží pro detekci upravené alely. Dole jsou sekvence jednořetězcových oligonukleotidů (ssODN) použitých jako templát pro homologní rekombinaci u kuřete a krocana.

Na obr. 2 je srovnání sekvence alely chNHE1 divokého typu (A) a po deleci kodónu pro W38 (B). Ukázáno jen bezprostřední okolí W38, které je vyznačeno šipkou. Sekvence znázorněna jako chromatogram s přepisem nukleotidové i aminokyselinové sekvence.

Na obr. 3 je znázorněna GFP pozitivita po infekci fibroblastů z embryí o genotypu W38 +/- (vlevo nahoře), W38 +/- (vpravo nahoře) a W38 +/+ (vlevo dole) měřená pomocí průtokové cytometrie. Na ose x intenzita GFP fluorescence, na ose y počty buněk. Procenta GFP pozitivních buněk v pravém dolním rohu histogramu. Vpravo dole souhrnný graf s procenty GFP pozitivních buněk u všech vyšetřovaných embryí (po čtyřech od každého genotypu).

Na obr. 4 je znázorněna kvantifikace virémie u kuřat genotypů W38 -/-, +/- a +/+ (vyznačeno na ose x) po infekci reportérovým vektorem RCASBP(J)GFP. Virémie stanovena (na ose y) jako relativní jednotky (násobky) negativní kontroly (infekce nespecifickým virem RCAS-A) po kvantitativní RT PCR.

Způsob podle vynálezu byl původci dobře ověřen v laboratořích Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha, CZ, a v BIOPHARMu a.s., Pohoří-Chotouň, CZ.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale nijak neomezuji.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Příprava linie kura domácího s modifikací receptorového genu chNHE1

Základem přípravy geneticky modifikovaných linií drůbeže je derivace primordiálních germinálních buněk z kuřecích embryí ve stáří 24 až 96 hodin. Tyto buňky byly kultivovány z odebraných vzorků embryonální krve, nebo z hlavové čisti embrya a expandovány *in vitro*. Delece W38 byla do genomu PGC zavedena pomocí CRISPR/Cas9 s gRNA specifickou pro oblast W38 v genu pro chNHE1 a templátu pro homologní rekombinaci s oblastí W38 (obr. 1). Konstrukt

kódující CRISPR/Cas9 s příslušnou gRNA a templát pro homologní rekombinaci byly do PGC vpraveny elektroporací v systému Amaxa. Po elektroporaci byly selektovány buňky pozitivní na fluorescenci GFP sdruženou s CRISPR/Cas9 s využitím třídění jednotlivých buněk na průtokovém cytometru. Dobře rostoucí expandovaný klon molekulárně ověřený na delecí W38 byl poté
 5 ortotopicky transplantován do sterilizovaných kohoutů-recipientů podle CZ patentu č. 307102. Po pěti měsících byla pozorována obnovená spermiogeneze a ejakuláty kohoutů-recipientů byly použity k umělé inseminaci slepic, nejdříve intramagnální a poté intravaginální. V potomstvu se vyskytovali výhradně jedinci heterozygotní pro delecí W38. Po dosažení pohlavní zralosti byli heterozygoti kříženi a v potomstvu G2 segregovaly v očekávaném poměru všechny genotypy, tj.
 10 W38 +/+, W38 +/- a W38 -/-. Shoda s očekávaným poměrem naznačuje, že delece W38 nepředstavuje pro nositele významnou zátěž, která by snižovala užitkovost v chovu. Delece W38 byla ověřována na všech úrovních (klony PGC, ejakulát kohoutů-recipientů, krev nebo pérova pulpa jedinců G1 a G2) molekulárně genetickými metodami, tj. izolací DNA, amplifikací specifického úseku chNHE1 polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a sekvenováním PCR
 15 produktu. Ukázky sekvencí DNA jsou na obr. 2.

Příklad 2

Průkaz rezistence nositelů delecí W38 vůči ALV-J

20 Rezistence jedinců W38 -/- byla prokazována třemi nezávislými způsoby, které jsou obvyklé ve virologickém výzkumu a které jsou specificky etablovány pro ALV-J.

A. In vitro infekce embryonálních fibroblastů

25 Embrya jedinců G2 byla inkubována do 10. dne vývoje a poté byly připraveny kultury embryonálních fibroblastů. Genotyp W38 byl ověřen izolací DNA, PCR a sekvenováním. Kultury embryonálních fibroblastů byly infikovány virem s receptorovou specificitou ALV-J, konkrétně reportérovým vektorem RCASBP(J)GFP, který pro jednoduchou detekci viru transdukuje reportérový gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Kvantitativní stanovení GFP bylo
 30 provedeno pomocí průtokové cytometrie. Embryonální fibroblasty s genotypy W38+/+ a W38+/- byly shodně GFP pozitivní v cca 90 % buněk, což indikuje téměř dokonalé promoření virem. Naopak, embryonální fibroblasty s genotypem W38-/- vykazovaly GFP pozitivitu v méně než 0,05 % buněk, což představuje přirozené pozadí dané autofluorescencí (obr. 3). Lze uzavřít, že genotyp
 35 W38-/- je dokonale rezistentní k infekci ALV-J na úrovni embryonálních fibroblastů.

B. In vivo infekce kuřat

40 Kuřata genotypů W38 +/+, W38 +/- a W38 -/- byla ve stáří od několika dní do 2 měsíců infikována reportérovým vektorem RCASBP(J)GFP, který zachovává receptorovou specificitu ALV-J a je přitom agresivnější než prototypové kmeny ALV-J, např. HPRS103. Normální průběh infekce ALV-J se projevuje transientní virémií, která podle stáří infikovaného jedince nastupuje po několika dnech, vrcholí zpravidla do 10 dnů a přetrvává jeden až dva týdny po vrcholu. Přítomnost viru *in vivo* byla tentokrát ověřována molekulárně, kvantitativní detekcí virové genomové RNA
 45 technikou reverzně transkriptázové kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR) i biologicky, komplementačním testem, při kterém replikačně kompetentní vnesený virus komplementuje defektivní virus, který je sekundárně kvantitativně stanoven na základě tvorby fokusů transformovaných buněk. Druhý způsob detekce ověřuje přítomnost biologicky aktivního viru, nikoli jen pouhé RNA. Vyšetřovaným materiálem bylo v obou případech sérum infikovaných
 50 zvířat odebrané ve dvou časových bodech, jeden a dva týdny po infekci. Pomocí RT-qPCR byla všechna kuřata genotypu W38-/- (celkem 5 kuřat) vyšetřena jako negativní v obou odběrech. Genotypy W38 +/+ a W38 +/- (celkem 10 kuřat) byly s jedinou výjimkou pozitivní v pozdějším odběru, v prvním odběru byla tři kuřata negativní, což znamená pomalý nástup virémie během prvního týdne a nárůst virémie během druhého týdne. Jediná negativita zde může znamenat neúspěšnou infekci, např. kvůli špatné inokulaci. Tyto výsledky jsou v souhrnu uvedeny v obr. 4.
 55

V komplementačním testu byly v prvním odběru zaznamenány jen ojedinělé pozitivita u genotypů W38 $+/+$ a W38 $+/-$. Ve druhém odběru byly odběry zvířat těchto genotypů s jedinou výjimkou (jedinec shodný s předchozím experimentem) pozitivní, zatímco všechny genotypy W38 $-/-$ zůstaly negativní (tab. 1). V souhrnu lze uzavřít, že delece W38 navozuje dokonalou rezistenci vůči ALV-J při inokulaci viru do krevního oběhu juvenilních jedinců. Tento typ infekce nejlépe simuluje přirozenou infekci v podmínkách domácího chovu.

Tabulka 1

Genotyp kuřat	Číslo kuřete	Stáří kuřat v době infekce (dny)	Titř viru (IU/ml)	
			6 dnů p.i.	13 dnů p.i.
W38 $-/-$	604	28	0	0
W38 $-/-$	606	28	0	0
W38 $-/-$	611	20	0	0
W38 $-/-$	612	20	0	0
W38 $-/-$	615	14	0	0
W38 $+/-$	601	28	0	10^1
W38 $+/-$	603	28	0	10^2
W38 $+/-$	605	28	0	10^1
W38 $+/-$	610	20	10^2	10^3
W38 $+/-$	616	20	0	10^3
W38 $+/-$	618	14	0	10^2
W38 $+/-$	619	14	10^1	10^3
W38 $+/+$	617	14	10^2	10^3

V tabulce 1 je ověření virémie u kuřat genotypů W38 $-/-$, $+/-$ a $+/+$ (kontrolní genotyp divokého typu) po infekci reportérovým vektorem RCASBP(J)GFP. Virémie stanovena jako titř komplementovaného defektivního viru 16Q a terminálním ředěním ve dvou odběrech séra, a to po 6 a 13 dnech po infekci.

C. Indukce nádorů virem pseudotypovaným ALV-J

Abychom simulovali tvorbu solidních tumorů po infekci ALV-J, pseudotypovali jsme transformující virus přítomný v křepelčí buněčné linii 16Q a obsahující onkogen *v-src* virem s receptorovou specifícou ALV-J, konkrétně vektorem RCASBP(J)GFP. Vzniká tak akutně transformující virus s onkogenem *v-src* obalený glykoproteinem viru ALV-J, který je schopen indukovat rychle rostoucí sarkomy v místě inokulace, v našem případě v křidelní řase. Byla inokulována kuřata ve stáří 10 dnů až dvou měsíců, incidence a růst sarkomů byly sledovány po dobu jednoho měsíce. Všechna kuřata genotypů W38 $+/+$ a W38 $+/-$ vyvinula progresívně rostoucí sarkomy, zatímco kuřata genotypu W38 $-/-$ nevyvinula nádor ani v jediném případě. Nádory u zvířat genotypu W38 $+/+$ rostly rychleji než nádory u kuřat genotypu W38 $+/-$, což indikuje mírný negativně dominantní efekt alely s delecí W38. To patrně souvisí s trimerizací chNHE1. Závěrem lze říci, že i v tomto experimentu se prokazuje (dokonalá) úplná rezistence vůči ALV-J v případě homozygotní delece W38.

Výše uvedené příklady přesvědčivě dokumentují, že nově vytvořená linie kura domácího způsobem podle vynálezu, která nese homozygotní delecí W38 v genu chNHE1, je dokonale rezistentní vůči patogennímu viru ALV-J při zachování jeho normálních růstových, reprodukčních a užitkových vlastností a bez jakýchkoli zjevných vedlejších efektů, což přináší veliký ekonomický efekt.

Průmyslová využitelnost

- Nový způsob přípravy geneticky upravené drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému viru podskupiny J, přináší naprosto originální řešení eradikace aviární leukózy ALV typu J a nabízí
 5 nový vytvořený model geneticky upravených jedinců s trvalou rezistencí vůči infekci ALV-J. Představuje tak naprosto revoluční způsob eradikace této choroby nejen v silných drůbežářských státech, např. v Číně a jihovýchodní Asii, ale i v dalších částech světa, protože toto onemocnění má potenciál k znovu zavlečení do oblastí, kde byl jeho původce již eradikován.

10 Seznam literatury:

- JURAJDA, Vladimír. Nemoci drůbeže a ptactva - virové infekce. 1. vyd. Brno: Ediční středisko VFU. Brno, 2002. 184 s. ISBN 80-7305-436-1.
- 15 Malhotra S, Justice J 4th, Lee N, Li Y, Zavala G, Ruano M, Morgan R, Beemon K: Complete genome sequence of an american avian leukosis virus subgroup j isolate that causes hemangiomas and myeloid leukosis. Genome Announcements 3(2): pii: e01586-14, 2015
- Plachý J, Reinišová M, Kučerová D, Šenigl F, Stepanets V, Hron T, Trejbalová K, Elleder D,
 20 Hejnar J.: Identification of New World quails susceptible to infection with avian leukosis virus subgroup J. Journal of Virology 91(3): e02002-16, 2017
- Reinišová M, Plachý J, Kučerová D, Šenigl F, Vinkler M, Hejnar J.: Genetic Diversity of NHE1, Receptor for Subgroup J Avian Leukosis Virus, in Domestic Chicken and Wild Anseriform Species. PloS One 11(3):e0150589)
 25

CZ patent č. 307102

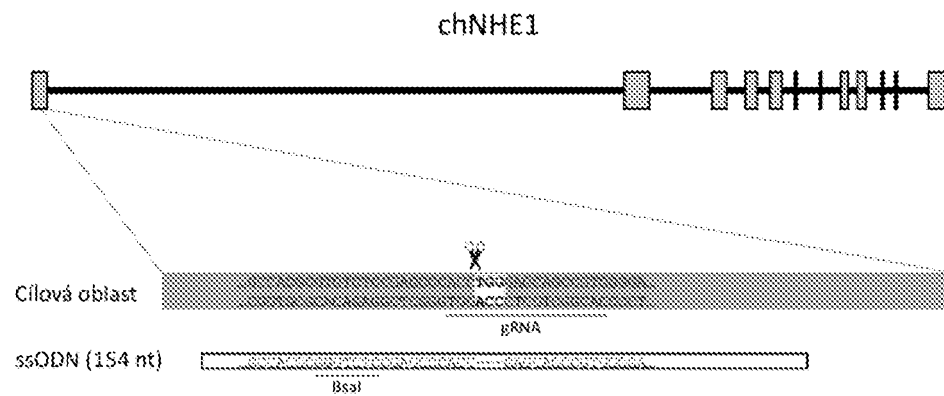
CZ patent č. 307285

PATENTOVÉ NÁROKY

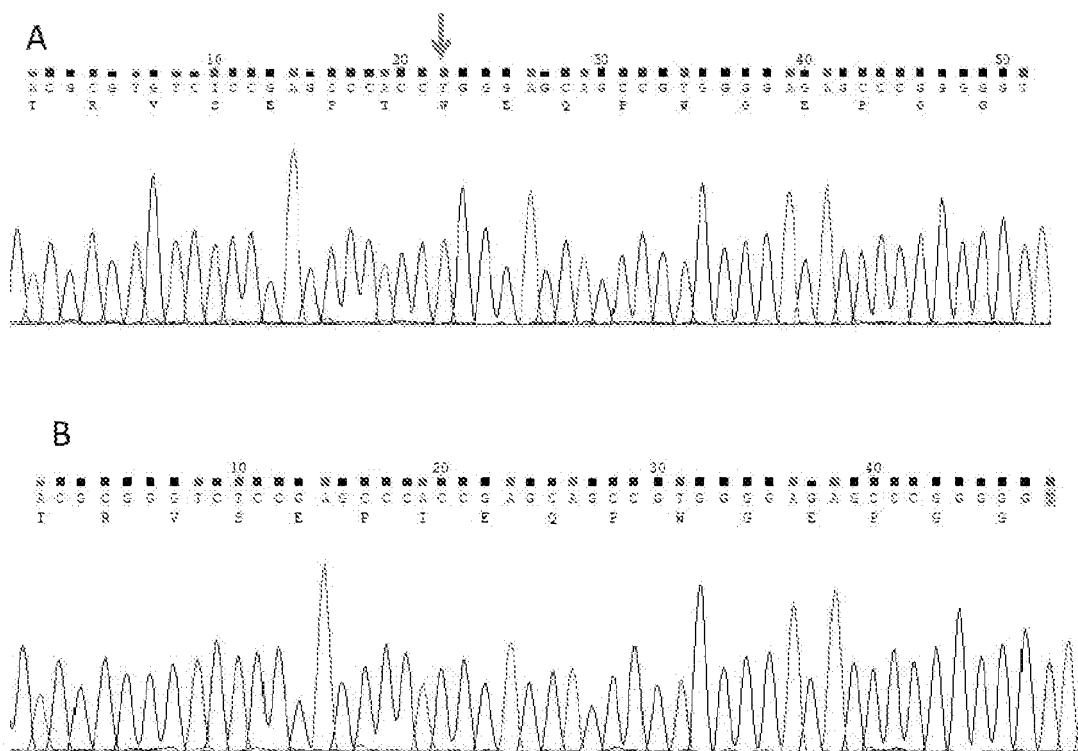
- 5 1. Způsob přípravy geneticky upravené drůbeže, rezistentní k ptačímu leukóзовému viru podskupiny J, **vyznačující se tím**, že tato drůbež nese delecí W38 zavedenou do genu chNHE1 pomocí homologní rekombinace mediované CRISPR/Cas9, případně že nese delecí W38 zavedenou pomocí CRISPR/Cas9 a specifickou sgRNA, za vzniku kura domácího nebo krocan domácího rezistentního vůči ptačímu leukóзовému viru ALV podskupiny J.

10

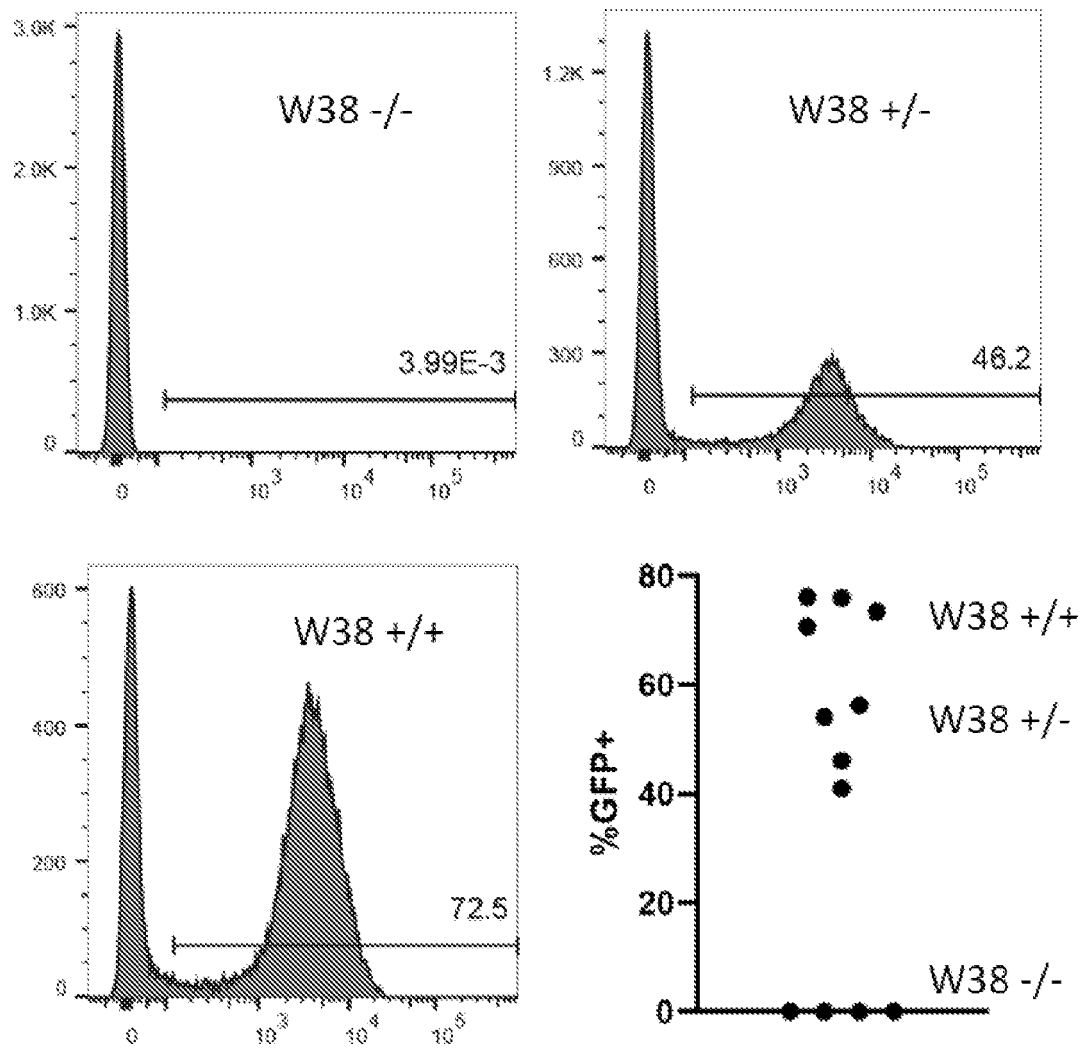
2 výkresy



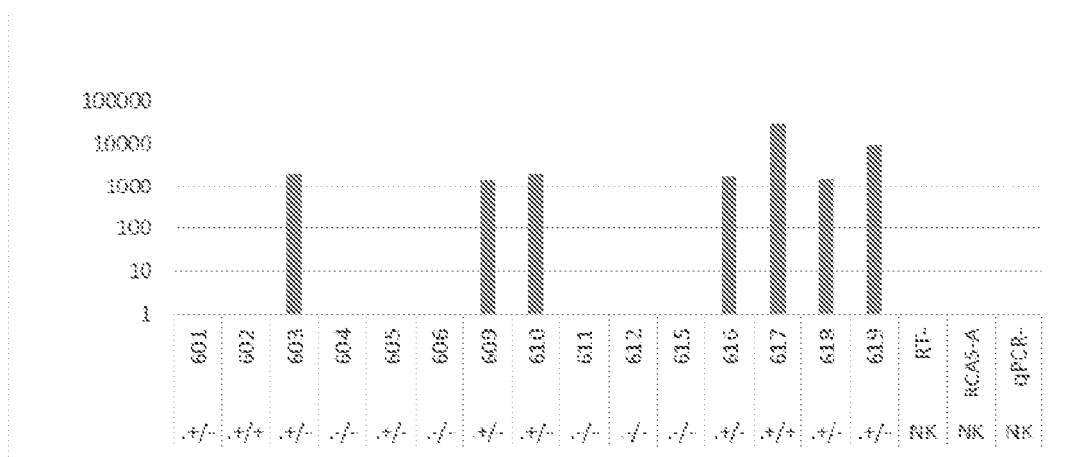
Obr. 1.



Obr. 2



Obr. 3.



Obr. 4.