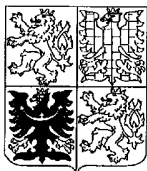


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.03.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.03.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19712507**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.03.2000**
(Věstník č. 3/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/01731**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/42852**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3390

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/82

C 07 K 16/44

C 12 N 15/13

A 01 H 5/00

A 01 N 63/00

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT,
Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Lerchl Jens, Ladenburg, DE;
Möller Achim, Grünstadt, DE;
Schmidt Ralf-Michael, Kirrweiler, DE;
Schiffer Helmut, Mutterstadt, DE;
Rabe Udo, Dannstadt-Schauernheim, DE;
Conrad Udo, Gatersleben, DE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Expresí polypeptidů vázajících herbicid v
roślinách k vytvoření tolerance k herbicidu**

(57) Anotace:

Způsob produkce rostlin tolerantních k herbicidu expresí
protilátky vážící herbicid v rostlinách.

13.12.99

PV1999-3390

EXPRESE POLYPEPTIDŮ VÁŽÍCÍCH HERBICID V ROSTLINÁCH
K VYTVOŘENÍ TOLERANCE K HERBICIDU

85361

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu produkce rostlin tolerantních k herbicidu expresí exogenního polypeptidu vážícího herbicid v rostlinách nebo rostlinných orgánech. Vynález se dále týká použití odpovídajících nukleových kyselin, které kódují polypeptid, protilátku nebo části protilátky se schopnostmi vázat herbicid u transgenních rostlin, a takto transformované rostliny samotné.

Dosavadní stav techniky

Je známo, že metody genového inženýrství dovolují specifický transfer cizích genů do genomu rostliny. Tento způsob se nazývá transformace a výsledné rostliny transgenní rostliny. Transgenní rostliny se v současnosti používají v různých oblastech biotechnologie. Příklady rostlin rezistentních ke hmyzu: Vaek a kol., Plant Cell, 5, 159-169 (1987), rostlin rezistentních k fagům: Powell a kol., Science, 232, 738-743 (1986) a rostlin rezistentních k ozónu: Van Camp a kol., BioTech., 12, 165-168 (1994). Příklady zlepšených kvalitativních vlastností dosažených genovým inženýrstvím jsou: zvýšená trvanlivost plodu /Oeller a kol., Science, 254, 437-439 (1991)/, zvýšená produkce škrobu u bramborových hlíz /Stark a kol., Science, 242, 419 (1992)/, změny ve skladbě škrobu /Visser a kol., Mol. Gen. Genet., 225, 289-296 (1991)/ a lipidů /Voelker a kol.,

Science, 257, 72-74 (1992)/ a produkce cizích polymerů /Poirer a kol., 256, 520-523 (1992)/.

Důležitým cílem práce prováděné v oblasti molekulární genetiky rostlin je vytvoření tolerance k herbicidům. Tolerance k herbicidům je charakterizovaná zvýšenou kompatibilitou (ve smyslu druhu nebo úrovně) rostliny nebo rostlinných orgánů k použitému herbicidu. To se může uskutečnit různými způsoby. Známým způsobem je využití metabolického genu, například pat genu, v souvislosti s glufosinátovou resistencí (WO 87/05629) nebo terčového enzymu, který je resistantní na herbicid, jako například v případě enolpyruvátšikimát-3-fosfátsyntázy (WO 92/04449), který je resistantní na glyfozát, a použití herbicidu v buněčné a tkáňové kultuře k selekci tolerantních rostlinných buněk a výsledných resistantních rostlin, jako je popsáno v případě inhibitorů acetyl-CoA-karboxylázy (US patent č. 5 162 602, US patent č. 5 290 696).

Protilátky jsou proteiny jako složky imunitního systému. Společným rysem všech protilátek je jejich prostorová, globulární struktura, stavba lehkých a těžkých řetězců a jejich základní schopnost vazby molekul nebo částí molekulární struktury s vysokou specifitou /Alberts, a kol. In: Molekularbiologie der Zelle [Molekulární biologie buňky], 2.vyd., VCH Verlag, ISBN 3-527-27983-0, 1198-1237 (1990)/. Na základě těchto vlastností se protilátky využily k mnoha účelům. Aplikaci lze rozdělit na použití protilátek ve zvířecích a rostlinných organismech, ve kterých se produkují, tj. tak zvaná aplikace in situ, a aplikaci ex situ, tj. použití protilátek po jejich izolaci z produkujících buněk nebo organismů /Whitelam a Cockburn, TIPS, sv.1, 8, 268-272 (1996)/.

Použití somatických linií hybridních buněk (hybridomů) jako zdroje protilátek proti velmi specifickým antigenům je založeno na práci provedené Köhlerem a Milsteinem /Nature, 256, 495-497 (1975)/. Tento způsob umožňuje, aby byly produkovány tak zvané monoklonální protilátky, které mají rovnoměrnou strukturu a které jsou produkovány prostřednictvím buněčné fúze. Buňky sleziny imunizované myši fúzí s myšími myelomovými buňkami. Tím se poskytnou buněčné hybridomy, které nekonečně proliferují. Ve stejnou dobu buňky produkují specifické protilátky proti antigenu, kterým byla myš imunizována. Buňky sleziny poskytují schopnost produkovat protilátku, zatímco buňky myelomu přispívají ke kapacitě neomezeného růstu a kontinuální sekreci protilátek. Protože každá klonovaná buňka hybridomu je odvozena od jedné B-buňky, všechny produkované molekuly protilátek mají stejnou strukturu, včetně místa vázícího antigen. Tento způsob značně napomohl použití protilátek, protože protilátky, které mají jednotnou, známou specifitu a homogenní strukturu, jsou nyní dostupné v neomezeném množství. Monoklonální protilátky se široce používají v imunodiagnostice a jako terapeutické látky.

V posledních letech se stala dostupnou k produkci protilátek tak zvaná metoda vystavení fagu a zde se vylučuje imunitní systém a různé imunizace zvířat. Afinity a specifity protilátek se provádí měřením in vitro /Winter a kol., Ann. Rev. Immunol., 12, 433-455 (1994); Hoogenboom, TIBTech, sv. 15, 62-70 (1997)/. Genové segmenty, které obsahují sekvenci kódující variabilní oblast protilátek, tj. místo vazby antigenu, fúzí s geny plášťového proteinu bakteriofagu. Potom se bakterie infikují fagy, které obsahují tyto fúzní geny. Výsledné fagové částice jsou nyní

opatřeny pláští obsahujícími fúzní protein podobný protilátce s doménou vážící protilátku vystavenou na povrchu. Taková knihovna předložených fagů se nyní může použít k izolaci fagu, který obsahuje požadovaný fragment protilátky, a který se specificky váže na určitý antigen. Každý fag izolovaný tímto způsobem produkuje monoklonální polypeptid vážící antigen, který odpovídá monoklonální protilátce. Geny pro místo vazby antigenu, které jsou stejné pro každý fag, se mohou izolovat z fagové DNA a použít k sestavení kompletních genů protilátek.

V oblasti ochrany úrody se protilátky využily zejména jako analytické prostředky ex situ ke kvalitativní a kvantitativní detekci antigenů. To zahrnuje detekci rostlinných složek, herbicidů nebo fungicidů v pitné vodě /Sharp a kol., Pestic. Residues Food Saf. v: ACS Symp Ser., 446, 87-95 (1991)/, vzorkách půdy (WO 94/23018) nebo v rostlinách nebo rostlinných orgánech, a využití protilátek jako auxiliantů k purifikaci vazebných molekul.

Produkci imunoglobulinů rostlinami poprvé popsal Hiatt a kol., Nature, 342, 76-78 (1989). Spektrum zahrnuje protilátky od protilátek s jednoduchým řetězcem až do multimerních sekrečních protilátek /J. Ma a Mich Hein, Annuals New York Academy of Sciences, 72-81 (1996)/.

Pozdější snahy využívají protilátky in situ k ochraně rostlin před patogeny, zvláště fagovými chorobami, expresí specifických protilátek nebo jejich částí u rostlinných buněk, které jsou zaměřeny proti fagovým plášťovým proteinům /Tavladoraki a kol., Nature, 366, 469-472 (1993); Voss a kol., Mol. Breeding, 1, 39-50 (1995)/.

Analogický přístup se také využil k ochraně rostlin proti infikaci nematody /Rosso, a kol., Biochem. Biophys. Res. Com., 220, 255-263 (1996)/. Existují příklady použití ve farmakologii, kdy se exprese protilátek in situ u rostlin využije k perorální imunizaci /Ma a kol., Science, 268, 716-719 (1995); Mason a Arntzen, Tibtech, sv. 13, 388-392 (1996)/. Do těla se vpraví protilátky vytvořené rostlinami a pocházející z rostlin nebo rostlinných orgánů, které jsou vhodné ke konzumaci ústy, hrdlem nebo trávicím traktem, a tyto protilátky způsobují dostatečnou imunoprotekci. Kromě toho se již exprimovala v rostlinách protilátka s jednoduchým řetězcem proti rostlinnému hormonu o nízké molekulové hmotnosti, kyselině abscisové, a upozorovala se snížená dostupnost rostlinných hormonů díky vazbě kyseliny abscisové v rostlině /Artsaenko a kol., The Plant Journal, 8(5), 754-750 (1995)/.

Chemická regulace plevelu v agronomicky důležitých užitkových rostlinách vyžaduje použití vysoce selektivních herbicidů. V některých případech je tedy obtížné vyvinout dostatečně selektivní herbicidy, které nezpůsobí poškození rostliny poskytující úrodu. Poskytnutí užitkových rostlin resistantních nebo tolerantních k herbicidu může přispět k řešení tohoto problému.

Vývoj užitkových rostlin resistantních k herbicidu tkáňovou kultivací nebo mutagenezí semen a přirozeným výběrem je omezený. Způsoby manipulace tkáňovou kultivací jsou možné jen s takovými rostlinami, které jsou celé schopny úspěšně se regenerovat z tkáňových kultur. Navíc mohou užitkové rostliny následnou mutagenezí a selekcí projevit nežádoucí vlastnosti, které se musí znovu eliminovat, v některých případech opakovaným, zpětným

13.12.99

křížením. Také poskytnutí rezistence provedením křížení by se mohlo u některých druhů rostlin omezit.

Z výše zmíněných důvodů je snaha genovým inženýrstvím izolovat gen kódující rezistenci a transferovat jej do užitkových rostlin cíleným způsobem nadřazená tradičnímu způsobu křížení rostlin.

Je zaznamenáno, že vývoj užitkových rostlin tolerantních nebo resistantních k herbicidu způsoby molekulární biologie, vyžaduje znalost mechanismu účinku herbicidu v rostlině, a také že mohou být nalezeny geny, které udělují rezistenci k herbicidu. Široké množství herbicidů, které se nyní obchodně používají, působí bloádou enzymu v kroku biosyntézy esenciální aminokyseliny, lipidu nebo pigmentu. Tolerance k herbicidu se může vytvořit změnou genů těchto enzymů takovým způsobem, že herbicid se nemůže déle vázat, a vsunutím těchto pozměněných genů do užitkových rostlin. Alternativním příkladem je nalezení analogických enzymů v přírodě, například v mikroorganismech, které projevují přirozenou resistenci k herbicidu. Tento rezistenci udělující gen se z takového mikroorganismu izoluje, opět klonuje do vhodných vektorů a následně, po úspěšné transformaci, exprimuje v užitkových rostlinách senzitivních k herbicidu (WO 96/38567).

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu bylo vyvinout nový, obecně použitelný způsob genového inženýrství k produkci transgenních rostlin tolerantních k herbicidu.

13.10.99

Přihlašovatelé zjistili, že tohoto předmětu se v rostlinách překvapivě dosáhne způsobem exprese exogenního polypeptidu, protilátky nebo částí protilátky se schopnostmi vázat herbicid.

Tento vynález se především týká produkce protilátky vážící herbicid a klonování příslušného genu nebo fragmentu genu.

Prvním krokem je produkce vhodné protilátky, která váže herbicid. Ten se může uskutečnit mimo jiné imunizací obratlovce, ve většině případů myši, krysy, psa, koně, osla nebo kozy, antigenem. Antigenem je v tomto případě fungicidně účinná sloučenina, které je asociovaná nebo vázaná prostřednictvím funkční skupiny k nosné látce o vysoké molekulové hmotnosti, jako například k bovinnímu sérovému albuminu (BSA), kuřecímu ovalbuminu, keyhole limpet hemocyaninu (KLH) nebo jiným nosným látkám. Po opakovanému použití antigenu se imunitní odpověď monitoruje běžnými způsoby, a tím se izoluje vhodné antisérum. Nejprve tento způsob poskytuje polyklonální sérum, které obsahuje protilátky s odlišnou specificitou. K cílenému použití in-situ je nezbytné izolovat sekvenci genů, která kóduje jedinou, specifickou, monoklonální protilátku. K tomuto účelu se hodí široká škála způsobů. První přístup využívá fúzi buněk produkujících protilátku a buněk karcinomu k poskytnutí kultury hybridomových buněk, které kontinuálně produkují protilátky, a které nakonec, sjednocením získaných klonů, vedou k homogenní buněčné linii, která produkuje definovanou monoklonální protilátku.

cDNA protilátky, nebo částí protilátky, viz tak zvaná protilátka s jednoduchým řetězcem (scFv), se izoluje

13.12.99

z takové monoklonální buněčné linie. Tyto sekvence cDNA se pak mohou klonovat do expresních kazet a použít k funkční expresi u prokaryontních a eukaryontních organismů, včetně rostlin.

Alternativně je možná selekce protilátek prostřednictvím knihoven poskytnutých fagů a molekul herbicidů vážících tyto protilátky, a katalyticky je přeměnit na produkt bez fungicidních vlastností. Způsoby pro produkci katalytických protilátek popisuje Janda a kol., Chemical selection for catalysis in combinatorial Antibody libraries, v: Science, 275, 945-948 (1997); Catalytic Antibodies, Ciba Foundation Symposium 159, Wiley-Interscience Publication, 1991. Klonování genu této katalytické protilátky a jeho exprese v rostlině může v podstatě také vést k rostlině resistantní k herbicidu.

Tento vynález se týká zejména expresních kazet, jejichž kódující sekvence kódují polypeptidy vážící herbicid nebo jejich funkcí ekvivalenty a použití těchto expresních kazet k produkci rostlin resistantních na herbicidy. Sekvence nukleové kyseliny může být například sekvence DNA nebo cDNA. Kódující sekvence, které jsou vhodné k inzerci do expresní kazety podle tohoto vynálezu, jsou například ty, které obsahují sekvenci DNA z hybridomových buněk, která kóduje polypeptid se schopnostmi vazby herbicidu, a tím poskytují rezistenci hostitele k inhibitorům rostlinných enzymů.

Kromě toho expresní kazety podle tohoto vynálezu obsahují regulační sekvence nukleových kyselin, které řídí expresi kódující sekvence v hostitelské buňce. V upřednostňovaném ztělesnění obsahuje expresní kazeta podle tohoto vynálezu předřazenou sekvenci, tj. na konci 5'

kódující sekvence, promotor a zařazenou sekvenci, tj. na konci 3', polyadenylační signál, a je-li to vhodné, jiné regulační elementy, které jsou operativně spojeny se zprostředkující kódující sekvencí pro polypeptid se schopnostmi vazby herbicidu a/nebo pro tranzitní peptid. Operativním spojením se rozumí ve významu sekvenčního uspořádání promotoru, kódující sekvence, terminátoru a, je-li to vhodné, jiných regulačních elementů, tím způsobem, že každý z regulačních elementů může působit podle svého určení, exprimuje-li se kódující sekvence. Sekvence upřednostňované k operativnímu spojení, ale ne omezené pouze k tomuto účelu, jsou terčové sekvence pro zajištění subcelulární lokalizace v apoplastech, v plasmatické membráně, ve vakuole, v plastidech, v mitochondriích, v endoplazmatickém retikulu (ER), v jádře, v liposomech, nebo jiných kompartmentech, a enhancery translace, jako například 5' zaváděcí sekvence z fagu tabákové mozaiky /Gallie a kol., Nucl. Acids Res., 15, 8693-8711 (1987)/.

Vhodnými promotory (doslovná citace) expresní kazety podle tohoto vynálezu je v zásadě jakýkoliv promotor, který je schopen řídit expresi cizích genů. Výhodně používanými promotory jsou zejména promotory odvozené z rostlin nebo promotory pocházející z rostlinného viru. Zvláště upřednostňovaným je promotor CaMV 35S z viru mozaiky kvěťáku /Franck, a kol., Cell, 21, 285-294 (1980)/. Tento promotor obsahuje různé rozpoznávací sekvence pro efekторы transkripce, které ve své celistvosti vedou k nepřetržité a konstitutivní expresi vnesených genů /Benfey a kol., EMBO J., 8, 2195-2202 (1989)/.

Expresní kazeta podle vynálezu může také obsahovat chemicky indukovatelný promotor, jehož prostřednictvím může

13.12.99

být v určitém okamžiku regulována exprese exogenního polypeptidu v rostlině. Tyto promotory, jako například promotor PRP1 /Ward a kol., Plant. Mol. Biol., 22, 361-366 (1993)/, promotor, který je indukovatelný kyselinou salicylovou (WO 95/1919443), promotor, který je indukovatelný benzensulfonamidem (evropský patent č. 388 186), promotor, který je indukovatelný kyselinou abscisovou (evropský patent č. 335 528), nebo promotor, který je indukovatelný ethanolem nebo cyklohexanonem (WO 93/21334), byly popsány v literatuře a mohou se mezi jinými použít.

Jiné promotory, které se zvláště upřednostňují, jsou takové, které zajišťují expresi ve tkáních nebo rostlinných orgánech, ve kterých se uskutečňuje herbicidní účinek. Zvláštní zmínku zasluhují promotory, které zajišťují listově specifickou expresi. Je nutné se zmínit o promotoru cytosolické FBPázy brambor nebo promotoru ST-LSI brambor /Stockhaus a kol., EMBO J., 8, 2445-2450 (1989)/.

Stabilní exprese protilátek s jednoduchým řetězcem, které obnáší až 0,67 % celkového rozpustného proteinu semen v semenech transgenních rostlin tabáku, byla umožněna pomocí semenově specifického promotoru /Friedler a Conrad, Bio/Technology, 10, 1090-1094 (1995)/. Protože exprese může být také možná v semenech, které byly zasety nebo které jsou v procesu klíčení, a mohou se vyžadovat pro účely tohoto vynálezu, jsou takové germinativně a semenově specifické promotory také regulačními elementy, které se upřednostňují v souladu s tímto vynálezem. Expresní kazeta v souladu s tímto vynálezem může tedy obsahovat například semenově specifický promotor (přednostně promotor USP nebo LEB4), signální peptid LEB4, gen, který se má exprimovat a retenční

13.12.99

signál ER. Sestavení kazety je ukázáno prostřednictvím příkladu ve formě diagramu na obrázku 1 s odkazem na protilátku s jednoduchým řetězcem (gen scFv).

Expresní kazeta podle tohoto vynálezu se vytvoří fúzí vhodného promotoru s vhodnou polypeptidovou DNA a přednostně s DNA, která kóduje vnesený chloroplastově specifický transitní peptid, a která je vsunuta mezi promotor a polypeptidovou DNA, a polyadenylačním signálem, použitím běžných rekombinantních a klonovacích způsobů, jak je popisuje například Maniatis, T., Fritsch, E.F. a Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989), a také Silhavy, T.J., Berman, M.L. a Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1984) a Ausubel, F.M. a kol., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Zvláště se upřednostňují sekvence, které umožňují cílenou distribuci (targeting) do apoplastu, plastidů, vakuoly, do plazmatické membrány, do mitochondrií, do endoplazmatického retikula (ER), nebo chybením vhodných operativních sekvencí setrvání v místě tvorby, jmenovitě v cytosolu (Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci*, 15(4), 285-423 (1996)). Lokalizace v ER a v buněčné stěně se ukázala být obzvláště přínosnou pro kvantitativní akumulaci proteinu v transgenních rostlinách /Schouten a kol., *Plant Mol. Biol.*, 30, 781-792 (1996); Artsaenko a kol., *Plant J.*, 8, 745-750 (1995)/.

Tento vynález se dále týká expresních kazet, jejichž kódující sekvence kóduje fúzní protein vážící herbicid,

13.12.99

přičemž část fúzního proteinu je tranzitní peptid, který řídí translokaci polypeptidu. Zvláště se upřednostňují chloroplastově specifické transitní peptidy, které se po přemístění polypeptidu vážícího herbicid do rostlinných chloroplastů enzymaticky odštěpují od části polypeptidu vážícího herbicid. Zvláště se upřednostňuje tranzitní peptid odvozený z transketolázy plastidů (TK) nebo funkčního ekvivalentu tohoto tranzitního peptidu (například tranzitní peptid malé podjednotky enzymu Rubisco nebo ferredoxin-NADP-oxidoreduktázy).

Polypeptidová DNA nebo polypeptidová cDNA požadovaná k vytvoření expresních kazet podle tohoto vynálezu se přednostně amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Způsoby amplifikace DNA použitím PCR jsou známy, například Innis a kol., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990). Fragmenty DNA produkované pomocí PCR se mohou výhodně kontrolovat sekvenční analýzou k omezení chyb polymerázy v konstrukcích k expresi.

Vložená sekvence nukleotidů, která kóduje polypeptid vážící herbicid, se může vytvořit synteticky nebo získat přirozenou cestou, nebo zahrnuje směs syntetických a přirozených komponent DNA. Obvykle se připravují syntetické sekvence nukleotidů s kodóny, které jsou rostlinami upřednostňovaně připravovány. Tyto kodóny, které rostliny upřednostňují, mohou být stanoveny podle kodónů, jejichž proteiny se nejvíce opakují a které se exprimují u většiny zajímavých rostlinných druhů. Jestliže se připravuje expresní kazeta, může se s různými fragmenty DNA manipulovat tak, aby se obdržela sekvence nukleotidů, která je výhodně čtena ve správném smyslu, a která je opatřena správným

čtecím rámcem. Ke vzájemnému propojení fragmentů DNA se mohou k fragmentům přidat přechodníky nebo spojovníky.

Oblasti promotoru a terminátoru podle tohoto vynálezu by měly být výhodně vybaveny ve směru transkripce spojovníkem nebo několika spojovníky, které zahrnují jedno nebo více restričních míst k inzerci této sekvence. Zpravidla má spojovník 1 až 10, obvykle 1 až 8, výhodně 2 až 6 restričních míst. V regulačních oblastech má spojovník obvykle velikost méně než 100 bp (párů bází), často méně než 60 bp (párů bází), ale nejméně 5 bp (párů bází). Promotor podle tohoto vynálezu může být buďto nativní nebo homologní, anebo jinak cizí nebo heterologní hostitelské rostlině. Expresní kazeta podle tohoto vynálezu se skládá ve směru transkripce 5'-3' z promotoru podle tohoto vynálezu, některé požadované sekvence a oblasti k terminaci transkripce. Různé terminační oblasti jsou dle potřeby vzájemně směnitelné.

Dále se mohou použít manipulace, které poskytují vhodná restriční místa nebo které odstraňují nadbytek DNA nebo restričních míst. Tam, kde jsou možné inserce, delece nebo substituce, například tranzice a transverze, se může použít mutagenese in vitro, „reparace primeru“, restrikce nebo ligace. V případě vhodných manipulací, jako například restrikce, „zpětného křížení“ nebo doplnění projekcí „tupými konci“ se mohou pro účely ligace poskytnout komplementární konce fragmentů.

Obzvláště důležité pro úspěch podle tohoto vynálezu je připojení specifického ER retenčního signálu SEKDEL /Schuoten A. a kol., Plant Mol. Biol., 30, 781-792 (1996)/, se kterým je průměrná expresní četnost trojnásobná až čtyřnásobná. K sestavení kazety se také mohou použít jiné

retenční signály, které se přirozeně vyskytují v rostlinných a živočišných proteinech, které jsou lokalizované v ER.

Upřednostňované polyadenylační signály jsou rostlinné polyadenylační signály, výhodně takové, které v podstatě odpovídají t-DNA polyadenylačním signálům z *Agrobacterium tumefaciens*, zvláště genu 3 t-DNA (oktopinsyntáza) Ti plazmidu pTiACH5 /Gielen a kol., EMBO J., 3, 835 a násl. (1984)/ nebo funkčním ekvivalentům.

Expresní kazeta podle tohoto vynálezu může obsahovat například konstitutivní promotor (přednostně promotor CaMV 35S), signální peptid LeB4, gen k expresi a ER retenční signál. Konstrukce kazety je ukázána jako diagram na obrázku 2 s odkazem na protilátku s jednoduchým řetězcem (gen svFv). Sekvence aminokyselin KDEL (lysin, kyselina asparaginová, kyselina glutamová, leucin) se výhodně používá jako ER retenční signál.

Fúzovaná expresní kazeta, která kóduje polypeptid, se schopnostmi vazby herbicidu, se přednostně klonuje do vektoru, například pBin19, který se hodí k transformaci *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacteria*, která jsou transformována takovým vektorem, se pak mohou použít pro transformaci rostlin známým způsobem, zvláště užitkových rostlin, například rostlin tabáku, například ponořením porušených listů nebo listových řezů do roztoku *Agrobacterií*, a následnou kultivací ve vhodném mediu. Transformaci listů prostřednictvím *Agrobacterií* objasnili, mimo jiné, White, F.F., Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, v: Transgenic Plants, sv. 1, Engineering and Utilization, editor Kung, S.D. a Wu, R., Academic Press, 15-38 (1993) a Gelvin, S.B., Molecular Genetics of t-DNA

Transfer from Agrobacterium to Plants, také v Transgenic Plants, str.49 až 78. Transgenní rostliny se známým způsobem mohou regenerovat z transformovaných buněk porušených listů nebo listových řezů, a tyto transgenní rostliny obsahují gen pro expresi polypeptidu se schopnostmi vazby herbicidu, integrovaný do expresní kazety podle tohoto vynálezu.

K transformaci hostitelské rostliny DNA kódující polypeptid vážící herbicid se expresní kazeta podle tohoto vynálezu inkorporuje inzercí do rekombinantního vektoru, jehož DNA obsahuje další funkční regulační signály, například sekvence k replikaci nebo integraci. Vhodné vektory se popisují mimo jiné v „Methods in Plant Molecular Biology and Technology“, CRC Press, kapitola 6/7, str. 77 až 119 (1993).

Použitím výše citovaných způsobů rekombinace a klonování se mohou expresní kazety podle tohoto vynálezu klonovat do vhodných vektorů, které jim umožňují multiplikaci, například v E. coli. Vhodné vektory klonování jsou, mimo jiné, pBR332, série pUC, série M13mp a pACYC184. Zvláště vhodné jsou binární vektory, které se mohou replikovat jak v E. coli, tak i v agrobakteriích, například pBin19 /Bevan a kol., Nucl. Acids Res., 12, 8711 (1980)/.

Tento vynález se dále týká použití expresní kazety podle tohoto vynálezu k transformaci rostlin, rostlinných buněk, rostlinných tkání nebo rostlinných orgánů. Upřednostňovaným zájmem při použití je způsobení resistance k inhibitorům rostlinných enzymů.

V závislosti na volbě promotoru, se exprese může uskutečnit specificky v listech, semenech nebo v jiných

roślinnych organach. Takové transgenní rostliny, jejich materiál k rozmnožování, a jejich rostlinné buňky, rostlinné tkáně nebo rostlinné orgány jsou dalším předmětem tohoto vynálezu.

Transfer cizích genů do genomu rostliny se nazývá transformace. V tomto způsobu se výše popsané způsoby transformace a regenerace rostlin z rostlinných tkání nebo rostlinných buněk využijí k přechodné nebo stálé transformaci. Vhodné způsoby jsou transformace protoplastu přes uptake DNA indukovaný polyethylenglykolem, biolistický přístup (doslovná citace) používající genový signál, elektroporace, inkubace vysušených embryí v roztoku obsahujícím DNA, mikroinjekce a genový transfer zprostředkovaný Agrobakteriem. Zmíněné způsoby se popisují například v Jenes, B. a kol., Techniques for Gene Transfer, v: Transgenic Plants, sv. 1, Engineering and Utilization, editoři: Kung, S.D. a Wu, R., Academic Press, 128-143 (1993) a v Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., 42, 205-225 (1991). Konstrukt k expresi se výhodně klonuje do vektoru, který je vhodný k transformaci Agrobacterium tumefaciens, například pBin19 /Bevan a kol., Nucl. Acids. Res., 12, 8711 (1984)/.

Agrobacterie, které se transformovaly expresní kazetou podle tohoto vynálezu, se potom mohou použít k transformaci rostlin, zvláště užitkových rostlin, jako jsou například obilniny, kukuřice, sója, rýže, bavlna, cukrová řepa, třtina, slunečnice, len, brambor, rajče, řepka olejka, vojtěška, salát a různé stromy, druhy ořešák a Vitis, například ponořením porušených listů nebo listových řezů do roztoku agrobakterií, a jejich následnou kultivací ve vhodném mediu.

Funkčně ekvivalentní sekvence, které kódují polypeptid vážící herbicid, jsou v souladu s vynálezem takové sekvence, které navzdory odlišné sekvenci nukleotidů ještě mají požadované funkce. Tedy funkční ekvivalenty zahrnují přirozeně se vyskytující varianty zde popsaných sekvencí, a také uměle vytvořené sekvence nukleotidů, například uměle vytvořené nukleotidové sekvence, které se získaly chemickou syntézou a jsou přizpůsobeny použití kodónu rostlinou.

Funkční ekvivalent má být především chápán jako přirozená nebo uměle vytvořená mutace původně izolované sekvence, která kóduje polypeptid vážící herbicid, a tato mutace vede k projevení požadované funkce. Mutace zahrnují substituce, adice, delece, výměny nebo inserce jednoho nebo více nukleotidových zbytků. Tento vynález tudíž také zahrnuje takové sekvence nukleotidů, které jsou získány modifikací sekvence nukleotidů. Záměrem takové modifikace může být například další omezení v ní obsažené kódující sekvence, nebo dále například inserce dalších štěpných míst pro restriční enzymy.

Jinými funkčními ekvivalenty jsou takové varianty, jejichž funkce je ve srovnání s výchozím genem nebo fragmentem genu více či méně vyjádřena.

Navíc uměle vytvořené sekvence DNA jsou vhodné tak dlouhé, že indukují požadovanou resistenci k herbicidům, jak se popisuje výše. Takové uměle vytvořené sekvence DNA mohou být identifikovány například proteiny zpětné translace, které mají herbicid-vážící aktivitu a které byly sestaveny prostřednictvím molekulárního modelování nebo selekcí in vitro. Zvláště vhodné jsou kódující sekvence DNA, které se

13.12.99

získaly zpětnou translaci polypeptidových sekvencí v souladu s využitím kodónu, který je specifický pro hostitelskou rostlinu. Použití specifického kodónu může rychle určit expert znalý způsobů rostlinné genetiky vyhodnocením jiných, známých genů transformované rostliny pomocí počítače.

Dalšími vhodnými ekvivalentními sekvencemi nukleových kyselin podle tohoto vynálezu, o kterých je nutné se zmínit, jsou sekvence, které kódují fúzní proteiny, ve kterých částí fúzního proteinu je polypeptid vážící herbicid nemající původ v rostlině nebo jeho funkčně ekvivalentní část. Druhou částí fúzního proteinu může být například další polypeptid s enzymatickou aktivitou, nebo antigenní sekvence polypeptidu, s jejíž pomocí je možná detekce exprese protilátek s jednoduchým řetězcem (scFvs) (například myc-tag nebo his-tag). Tudiž je to přednostně sekvence regulačního proteinu, například signálního nebo transitního peptidu, která směřuje polypeptid se schopnostmi vazby herbicidu do požadovaného místa působení.

Tento vynález se ovšem také týká produktů exprese, vytvořených v souladu s tímto vynálezem a fúzních proteinů tranzitního peptidu a polypeptidu se schopnostmi vazby herbicidu.

Resistance/tolerance pro účely tohoto vynálezu znamená uměle získanou schopnost rostlin odolávat působení inhibitorů rostlinných enzymů. To zahrnuje částečnou, a zejména úplnou necitlivost vůči těmto inhibitorům v trvání nejméně jedné generace rostliny.

Primárním místem působení herbicidů je obvykle tkáň listu, takže listově specifická exprese exogenního

13.12.99

polypeptidu vážícího herbicid je schopna poskytnout dostatečnou ochranu. Avšak ihned se pochopí, že účinek herbicidu nemusí být omezen na tkáň listu, ale může se také tkáňově specifickým způsobem uskutečňovat ve všech zbývajících orgánech rostliny.

Navíc je výhodná konstitutivní exprese exogenního polypeptidu vážícího herbicid. Na druhé straně může být také žádoucí indukovatelná exprese.

Účinnost transgenně exprimovaného polypeptidu se schopnostmi vazby herbicidu může být stanovena například in vitro množením meristémy výhonku na médiu obsahujícím herbicid v sériích se stupňujícími se koncentracemi nebo testy klíčení semen. Navíc může být tolerance k herbicidu testované rostliny, která se může lišit s ohledem na typ a úroveň, testována ve skleníkových experimentech.

Tento vynález se dále týká transgenních rostlin transformovaných expresní kazetou podle tohoto vynálezu a transgenních buněk, tkání, orgánů a materiálu k rozmnožování těchto rostlin. Zvláště se upřednostňují transgenní užitkové rostliny, jako například obilniny, kukuřice, sója, rýže, bavlna, cukrová řepa, třtina, slunečnice, len, brambor, tabák, rajče, řepka olejka, vojtěška, salát a různé stromy, druhy ořešák a Vitis.

Transgenní rostliny, rostlinné buňky, rostlinné tkáně nebo rostlinné orgány mohou být ošetřeny účinnou složkou, která inhibuje rostlinné enzymy, čímž rostliny, rostlinné buňky, rostlinné tkáně nebo rostlinné orgány, které se netransformovaly, úspěšně hynou. Příklady vhodných účinných složek jsou zejména kyselina 5-(2-chlor-4-

13.12.99

(trifluormethyl)fenoxy)-2-nitrobenzoová (acifluorfen) a kyselina 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylová (chinmerac) a metabolity a funkční deriváty těchto sloučenin. DNA, která kóduje polypeptid se schopnostmi vazby herbicidu a která byla vsunuta do expresní kazety podle tohoto vynálezu, se tudíž může použít jako selekční marker.

Tento vynález má tu výhodu, zvláště v případě užitkových rostlin, že jakmile dojde k indukci vybrané resistance užitkové rostliny k inhibitorům rostlinných enzymů, mohou se tyto inhibitory použít jako specifické herbicidy pro rostliny, které nejsou resistantní. Jako příklady, ale ne limitující, takových inhibitorů mohou být zmíněny herbicidní sloučeniny ze skupin b1-b41:

b1: 1,3,4-thiadiazoly:

buthidazol, cyprazol

b2 amidy:

allidochlor (CDAA), benzoylprop-ethyl, brombutin, chlorthiamid, dimepiperát, dimethenamid, difenamid, ethobenzanid (benzchlomet), flamprop-methyl, fosamin, isoxaben, monalid, naptalam, pronamid (propyzamid), propanil

b3 kyseliny aminofosforečné:

bilanafos (bialaphos), buminafos, amoniumglufozinát, glyfozát, sulfozát

b4 aminotriazoly:

amitrol

b5 anilidy:

anilofos, mefenacet

13.12.99

b6 kyseliny aryloxyalkanové:

2,4-D, 2,4-DB, klomeprop, dichlorprop, dichlorprop-P, dichlorprop-P (2,4-DP-P), fenoprop (2,4,5-TP), fluoroxypyr, MCPA, MCPB, mekoprop, mekoprop-P, napropamid, napropanilid, triklopyr

b7 kyseliny benzoové:

chloramben, dicamba

b8 benzothiadiazinony:

bentazon

b9 bělící činidla:

klomazon (dimethazon), diflufenikan, fluorchloridon, flupoxam, fluridon, pyrazolát, sulkotrion (chlormesulon)

b10 karbamáty:

asulam, barban, butylát, karbetamid, chlorbufam, chlorprofam, cykloát, desmedifam, diallát, EPTC, esprokarb, molinát, orbekarb, pebulát, fenizofam, fenmedifam, profam, prosulfokarb, pyributikarb, sulfallát (CDEC), terbukarb, thiobenkarb (benthocarb), thiokarbazil, triallát, vernolát

b11 kyseliny chinolinové:

chinchlorak, chinmerak

b12 chloracetanilidy:

acetochlor, alachlor, butachlor, butenachlor, diethatylethyl, dimethachlor, metazachlor, metolachlor, pretilachlor, propachlor, prynachlor, terbuchlor, thienylchlor, xylachlor

13.12.99

b13 cyklohexenony:

alloxydim, kaloxydim, klethodim, kloproxydim, cykloxydim, sethoxydim, tralkoxydim, 2-{1-[2-(4-chlorfenoxy)propyl-oxyimino]butyl}-3-hydroxy-5-(2H-tetrahydrothiopyran-3-yl)-2-cyklohexen-1-on

b14 kyseliny dichlorpropionové:

dalapon

b15 dihydrobenzofurany:

ethofumezát

b16 3-dihydrofuranony:

flurtamon

b17 dinitroaniliny:

benefin, butralin, dinitramin, ethafluralin, fluchloralin, isopropalin, nitralin, oryzalin, pendimethamin, prodiamin, profluralin, trifluralin

b18 dinitrofenoly:

bromfenoxim, dinoseb, dinosebacetát, dinoterb, DNOC,

b19 difenylethery:

acifluorfen - sodná sůl, aklonifen, bifenox, chlornitrofen (CNP), difenoxuron, ethoxyfen, flurdifen, fluorglykofen-ethyl, fomesafen, furyloxyfen, laktofen, nitrofen, nitrofluorfen, oxyfluorfen

b20 dipyridyleny:

cyperkvat, difenzokvat-methylsulfát, dikvat, parakvatdi-chlorid

13.12.99

b21 močoviny:

benzthiazuron, buturon, chlorbromuron, chloroxuron,
chlortoluron, cymyluron, dibenzyluron, cykluron, dimefuron,
diuron, dymron, ethidimuron, fenuron, fluormethuron,
isoproturon, isouron, karbutilát, linuron,
methabenzthiazuron, metobenzuron, metoxuron, monolinuron,
monuron, neburon, siduron, tebuthiuron, trimeturon

b22 imidazoly:

isokarbamid

b23 imidazolinony:

imazamethapyr, imazapyr, imazachin, imazetabenzmethyl
(imazam), imazethapyr

b24 oxadiazoly:

methazol, oxadiargyl, oxadiazon

b25 oxirany:

tridifan

b26 fenoly:

bromoxynil, ioxynil

b27 estery kyseliny fenoxifenoxypionové:

klodinafop, cyhalofop-butyl, diklofop-methyl, fenoxaprop-
ethyl, fenoxaprop-p-ethyl, fenthiapropethyl, fluazifop-
butyl, fluazifop-p-butyl, haloxyfop-ethoxyethyl, haloxyfop-
methyl, haloxyfop-p-methyl, isoxapyrifop, propachizafof,
chizalofopethyl, chizalofop-p-ethyl, chizalofop-tefuryl

13.12.99

b28 kyseliny fenylloctové:
chlorfenak (fenak)

b29 kyseliny fenylpropionové:
chlorfenoprop-methyl

b30 inhibitory protoporfyrinogen-IX-oxidázy:
benzofenap, cinidon-ethyl, flumiklorak-pentyl, flumioxazin,
flumipropin, flupropacil, fluthiacet-methyl, pyrazoxyfen,
sulfentrazon, thidiazimin

b31 pyrazoly:
nipyra klofen

b32 pyridaziny:
chloridazon, hydrazid kyseliny maleinové, norflurazon,
pyridát

b33 kyseliny pyridinkarboxylové:
klopyralid, dithiopyr, pikloram, thiazopyr

b34 pyrimidylethery:
pyrithiobak-kyselina, pyrothiobak-sodná sůl, KIH-2023, KIH-
6127

b35 sulfonamidy:
flumetsulam, methosulam

b36 sulfonylmočoviny:
amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron-methyl,
chlorimuronethyl, chlorsulfuron, cinosulfuron,
cyklosulfamuron, ethametsulfuronmethyl, ethoxysulfuron,
flazasulfuron, halosulfuronmethyl, imazosulfuron,

13.12.99

metsulfuron-methyl, nikosulfuron, primisulfuron,
prosulfuron, pyrazosulfuron-ethyl, rimsufuron, sulfometuron-
methyl, thifensufuron-methyl, triasulfuron, tribenuron-
methyl, triflusulfuron-methyl

b37 triaziny:

ametryn, atrazin, aziprotryn, cyanazin, cyprazin, desmetryn,
dimethamethryn, dipropetryn, eglinazin-ethyl, hexazinon,
procyazin, prometon, prometryn, propazin, sekbumeton,
simazin, simetryn, terbumeton, terbutryn, terbutylazin,
trietazin

b38 triazinony:

ethiozin, metamitron, metribuzin

b39 triazolkarboxamidy:

triazofenamid

b40 uracily:

bromacil, lenacil, terbacil

b41 jiné

benazolin, benfurezát, bensulid, benzofluor, butamifos,
kafenstrol, chlorthal-dimethyl (DCPA), cinmethylin,
dichlobenil, endothall, fluorbentrail, mefluidiol,
perfluidon, piperofos

Spektrum účinku funkčně ekvivalentních derivátů
inhibitorů rostlinných enzymů je srovnatelné se spektrem
účinku látek jednotlivě jmenovaných, zatímco inhibiční
aktivita (například vyjádřená v g inhibitoru na hektar

využitý ke kultivaci, požadovaná k úplnému potlačení růstu rostlin bez rezistence) je nižší, stejná nebo vyšší.

Vynález je nyní ilustrován následujícími příklady, ale neomezuje se na ně.

Obecné způsoby klonování

Kroky klonování provedené v rámci tohoto vynálezu, například restikční štěpení, elektroforéza v agarózovém gelu, purifikace fragmentů DNA, transfer nukleových kyselin k nitrocelulózovým a nylonovým membránám, spojování fragmentů DNA, transformace buněk *E. coli*, kultivace bakterií, multiplikace fagů a sekvenční analýza rekombinantní DNA se provedly způsobem, jak popsal Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 (1989).

Bakteriální kmeny použité dále (*E. coli*, XL-I Blue) se získaly od Stratagenu. Kmen agrobakterií použitý k transformaci rostlin (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 s plazmidem pGV2260 nebo pGV3850kan) popsal Deblaere a kol., Nucl. Acids Res., 13, 4777 (1985). Alternativně se také mohou použít kmen agrobakterií LBA4404 (Clontech) nebo jiné vhodné kmeny. K účelům klonování se použily vektory pUC19 /Yanish-Perron, Gene, 33, 103-119 (1985)/, pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 /Bevan a kol., Nucl. Acids Res., 12, 8711-8720 (1984)/ a pBinAR /Höfgen and Willmitzer, Plant Science, 66, 221-230 (1990)/.

Sekvenční analýza rekombinantní DNA

13.12.99

Molekuly rekombinantní DNA se sekvencovaly použitím laserově fluorescenčního přístroje pro sekvenční analýzu DNA od Pharmacia, použitím způsobu Sangera /Sanger a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)/.

Vytvoření expresní kazety rostliny

Provedla se inserce promotoru 35S CaMV do plazmidu pBin19 /Bevan a kol., Nucl. Acids Res., 12, 8711 (1984)/ ve formě fragmentu EcoRI-KpnI [odpovídajícím nukleotidům 6909-7437 fagu květákové mozaiky /Franck, a kol., Cell, 21, 285 (1980)/]. Polyadenylační signál genu 3 T-DNA Ti plazmidu pTiACH5 /Gielen a kol., EMBO J., 3, 835 (1984)/, nukleotidy 11749-11939, se izolovaly ve formě fragmentu PvuII-HindIII a po přidání spojovníků SphI se klonovaly do PvuII místa štěpení mezi SphI-HindIII místa štěpení vektoru. To poskytlo plazmid pBinAR /Höfgen a Willmitzer, Plant Science, 66, 221-230 (1990)/.

Příklady použití vynálezu

Příklad 1

Protože herbicidy nejsou imunogenní, musí se připojit k nosné látce, například KLH. Jestliže molekula obsahuje reaktivní skupinu, může se spojení uskutečnit přímo, jestliže ne, funkční skupina se zavede až po syntéze herbicidu, nebo se během syntézy zvolí reaktivní prekursor, aby se tyto molekuly připojily k nosné molekule v jediném reakčním kroku. Příklady spojovacích reakcí jsou k nalezení v Miroslavic Ferencik, Handbook of Immunochemistry, kapitola Antigens, Chapman & Hall, str.20 až 49 (1993).

13.12.99

K imunizaci například myši kmene Balb/c se používá opakovaná injekce této modifikované nosné molekuly (antigenu). Jakmile je dostačující množství protilátek s vazbou k antigenu detekovatelné ELISA testem (enzyme-linked immunosorbent assay), buňky sleziny těchto zvířat se odstraní a fúzí s buňkami myelomu za účelem kultivace hybridů. Herbicidem modifikovaný BSA se navíc používá jako antigen v ELISA testu, aby se diferencovala imunitní odpověď směřovaná proti haptenu z KLH odezvy.

Monoklonální protilátky se připraví způsoby podobnými známým způsobům, například jak se popisují v publikacích Leslie Hudson a Frank Hay, *Practical Immunology*, Blackwell Scientific Publications (1989) nebo James Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, Inc. (1983), nebo Liddell, J. a Cryer, A., *A practical guide to monoclonal antibodies*, John Wiley & Sons (1991) nebo Achim Möller a Franz Emling, *Monoklonale Antikörper gegen TNF und deren Verwendung* [Monoklonální protilátky proti TNF a jejich použití], evropský patent EP-A 260 610.

Příklad 2

Výchozím bodem výzkumu byla monoklonální protilátka, která specificky rozpozná herbicid chinmerak a která kromě toho má vysokou vazebnou afinitu. Zvolená linie hybridomových buněk se vyznačuje tím, že secernované monoklonální protilátky, které jsou namířeny proti herbicidnímu antigenu chinmeraku, mají vysokou afinitu, a že specifické sekvence imunoglobulinů jsou dostupné /Berek, C. a kol., *Nature*, 316, 412-418 (1985)/. Tato monoklonální

protilátka proti chinmeraku byla výchozím bodem pro konstrukci fragmentu protilátky s jedním řetězcem (scFv-antichinmerak).

Za prvé, z hybridomových buněk se izolovala mRNA a transkribovala do cDNA. Tato cDNA působila jako templát k amplifikaci variabilních imunoglobulinových genů VH a VK se specifickými primery VH1 BACK a VH FOR-2 pro těžký řetězec a VK2 BACK a MJK5 FON X pro lehký řetězec /Clackson a kol., *Nature*, 352, 624-628 (1991)/. Izolované variabilní imunoglobuliny byly výchozím bodem pro konstrukci fragmentu protilátky s jedním řetězcem (scFv-antichinmerak). V následné fúzi PCR se sloučily v reakci PCR tři složky VH, VK a spojovací fragment a ampifikoval se scFv-antichinmerak (obr. 3).

Funkční charakterizace (aktivita vazby antigenu) sestaveného genu scFv-antichinmeraku byla provedena po expresi v bakteriálním systému. K tomuto závěru se scFv-antichinmerak syntetizoval v *E. coli* jako fragment solubilní protilátky použitím způsobu podle Hoogenbooma, H.R. a kol., *Nucleic Acids Research*, 19, 4133-4137 (1991). Aktivita a specificita fragmentu sestavené protilátky se kontrolovala ELISA testem (obr. 4).

K umožnění semenově specifické exprese fragmentu protilátky u tabáku se gen scFv-antichinmeraku klonoval ve směru exprese z promotoru LeB4. Promotor LeB4, který se izoloval z *Vicia faba*, ukazuje přísně semenově specifickou expresi různých cizích genů u tabáku /Bäumlein, H. a kol., *Mol. Gen. Genet.*, 225, 121-128 (1991)/. Transport polypeptidu svFv-antichinmeraku do endoplazmatického retikula měl za následek stálou akumulaci velkých množství

fragmentu protilátky. K tomuto záměru se gen scFv-antichinmeraku fúzoval se sekvencí signálního polypeptidu, která zaručuje vstup do endoplazmatického retikula a s ER retenčním signálem SEKDEL, který zaručuje, že polypeptid zůstane v endoplazmatickém retikulu (Wandelt a kol., 1992) (obr. 5).

Sestavená expresní kazeta se klonovala do binárního vektoru pGSGLUC 1 (Saito a kol., 1990) a elektroporací přenesla do kmene *Agrobacterium* EHA 101. K následné transformaci *Nicotiana tabacum* se použily rekombinantní agrobakteriální klony. Z konstrukce se regenerovalo 70 až 140 rostlin tabáku. Následně po samoopylení z regenerovaných transgenních rostlin tabáku sklídila semena v různých stadiích vývoje. Po extrakci se do vodného roztoku pufrového systému z těchto semen získaly solubilní proteiny. Analýza transgenních rostlin ukázala, že fúze genu scFv-antichinmeraku s DNA sekvencí ER retenčního signálu SEKDEL umožnila, aby se ve zralém semeni poskytla maximální akumulace 1,9 % proteinu scFv-antichinmeraku.

Sestavený gen scFv-antichinmeraku měl velikost přibližně 735 párů bází. Variabilní domény se vzájemně fúzovaly do sekvence VH-L-VL.

Specifická selektivita se stanovila v extraktech ze zralých semen tabáku použitím přímého ELISA testu. Získané hodnoty jasně ukazují, že extrakty proteinu obsahují funkčně účinné fragmenty protilátek.

Semenově specifická exprese a koncentrace fragmentů protilátky s jedním řetězcem je v endoplazmatickém retikulu buněk semen transgenních semen tabáku, pod kontrolou USP promotoru.

Výchozím bodem výzkumů byl fragment protilátky s jedním řetězcem proti herbicidu chinmeraku (scFv-antichinmerak). Funkční charakterizace (účinek vazby antigenu) tohoto sestaveného genu scFv-antichinmeraku byla provedena po expresi v bakteriálním systému, a následně po expresi v tabákových listech. Aktivita a specifita sestaveného fragmentu protilátky se kontrolovala ELISA testem.

K umožnění semenově specifické exprese fragmentu protilátky u tabáku se gen scFv-antichinmeraku klonoval ve směru exprese z promotoru USP. Promotor USP, který se izoloval z *Vicia faba*, ukazuje přísně semenově specifickou expresi různých cizích genů u tabáku /Friedler, U. a kol., Plant Mol. Biol., 22, 669-679 (1993)/. Transport polypeptidu svFv-antichinmeraku do endoplazmatického retikula měl za následek stálou akumulaci velkých množství fragmentu protilátky. K tomuto záměru se gen scFv-antichinmeraku fúzoval se sekvencí signálního polypeptidu zaručující vstup do endoplazmatického retikula a s ER retenčním signálem SEKDEL, který zaručuje, že polypeptid zůstane v endoplazmatickém retikulu (Wandelt a kol., 1992) (obr. 1).

Sestavená expresní kazeta se klonovala do binárního vektoru pGSGLUC 1 (Saito a kol., 1990) a elektroporací přenesla do kmene *Agrobacterium* EHA 101. Rekombinantní agrobakteriální klony se použily k následné transformaci *Nicotiana tabacum*. Z regenerovaných transgenních rostlin tabáku se následně po samoopylení sklídila semena v různých

13.12.99

stadiích vývoje. Po extrakci do vodného roztoku pufru se z těchto semen získaly solubilní proteiny. Analýza transgenních rostlin ukázala, že fúze genu scFv-antiacifluorfeny (přesná citace) s DNA sekvencí ER retenčního signálního SEKDEL pod kontrolou promotoru USP způsobila syntézu fragmentů protilátek s jedním řetězcem s vazebnou afinitou pro chinmerak tak brzy, jako 10. den vývoje semene.

Příklad 4

K dosažení ubikvitární exprese fragmentu protilátky v rostlině, zvláště v listech, byl gen scFv-antichinmeraku klonován ve směru exprese z promotoru CaMV 35S. Tento silně konstitutivní promotor zprostředkovává expresi cizích genů prakticky ve všech rostlinných tkáních /Benfey a Chua, Science, 250, 956-966 (1990)/. Transport proteinu scFv-antichinmeraku do endoplazmatického retikula umožnil získat stálou akumulaci velkých množství fragmentu protilátky v listovém materiálu. Za prvé se gen scFv-antichinmeraku fúzoval se sekvencí signálního peptidu, který zajišťuje vstup do endoplazmatického retikula a s ER retančním signálem KDEL, který zajišťuje, že produkt zůstane v endoplazmatickém retikulu /Wandelt a kol., Plant J., 2, 181-192 (1992)/. Sestavená expresní kazeta se klonovala do binárního vektoru pGSGLOC 1 /Saito a kol., Plant Cell Rep., 8, 718-721 (1990)/ a elektroporací se přemístil do kmene Agrobakterium EHA 101. Rekombinantní agrobakteriální klony se použily k následné transformaci Nicotiana tabacum. Regenerovalo se přibližně 100 rostlin tabáku. Listový materiál různých vývojových stadií se odstranil z regenerovaných transgenních rostlin tabáku. Po extrakci se

13.12.99

získaly z tohoto listového materiálu do vodného roztoku pufru rozpustné proteiny. Následná analýza (Western blot analýza nebo ELISA testy) ukázala, že v listech se dostalo maximální akumulace biologicky aktivního polypeptidu scFv-antichinmeraku vážícího antigen více než 2 %. Vysoké hodnoty exprese se stanovily v plně vyvinutých zelených listech, ale fragment protilátky se také detekoval ve stárnoucím rostlinném materiálu.

Příklad 5

PCR amplifikace fragmentu cDNA kódujícího protilátku s jedním řetězcem proti acifluorfenu a chinmeraku pomocí syntetických oligonukleotidů.

PCR amplifikace protilátky cDNA s jedním řetězcem se uskutečnila v DNA termálním cyklotronu Perkin Elmer. Reakční směsi obsahovaly 8 ng/μl jednořetězcového templátu cDNA, 0,5 μM příslušných oligonukleotidů, 200 μM nukleotidů (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pufru (s hodnotou pH 8,3, při teplotě 25 °C, 1,5 mM MgCl₂) a 0,02 jedn./μM Taq polymerázy (Perkin Elmer). Podmínky amplifikace byly upraveny následujícím způsobem:

Teplota anelace:	45 °C
Teplota denaturace:	94 °C
Teplota elongace:	72 °C
Počet cyklů:	40

Výsledkem je fragment o počtu přibližně 735 párů bází, které se připojily (ligací) k vektoru pBluescript. Směs se po ligaci použila k transformaci E. coli XL-I Blue, a tento

13.12.99

plazmid se amplifikoval. Použití a optimalizace polymerázové řetězové reakce je ke zhlédnutí, viz Innis a kol., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990).

Příklad 6

Produkce transgenních rostlin tabáku, které exprimují cDNA kódující protilátku s jedním řetězcem se schopnostmi vazby herbicidu

Plazmid pGSSLUC 1 se transformoval do *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260. K transformaci rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) se použilo ředění 1:50 kultury pozitivně transformované agrobakteriální kolonie kultivované přes noc v Murashike-Skoogově médiu (Physiol. Plant., 15, 473 a násl. (1962)) obsahujícím 2 % sacharózy (médiu 2MS). Listové segmenty sterilních rostlin (každý přibližně o rozměru 1 cm²) se 5 až 10 min inkubovaly v Petriho misce v ředění agrobakterií 1:50. Poté následuje dvoudenní inkubace v temnu při teplotě 25 °C v 2MS médiu obsahujícím 0,8% Bacto-Agar. Kultivace pokračovala za 2 dny na světle 16 hodin, v temnu 8 hodin a pokračovala v týdenním rytmu v MS médiu obsahujícím 500 mg/l Claforanu (cefotaxim-sodná sůl), 50 mg/l kanamycinu, 1 mg/l benzylaminopurinu (BAP), 0,2 mg kyseliny naftyloctové a 1,6 g/l glukózy. Rostoucí výhonky se přemístily do MS media obsahujícího 2 % sacharózy, 250 mg/l Claforanu a 0,8% Bacto-Agar.

Příklad 7

Stálá akumulace fragmentu protilátky s jedním řetězcem proti herbicidu chinmeraku v endoplazmatickém retikulu

Výchozím bodem výzkumů byl fragment protilátky s jedním řetězcem proti herbicidu chinmeraku (scFv-antichinmerak), který se exprimuje u rostlin tabáku. Kvantita a aktivita syntetizovaného polypeptidu scFv-antichinmeraku se stanovila Western blot analýzou a ELISA testy.

K umožnění exprese genu scFv-antichinmeraku v endoplazmatickém retikulu se exprimoval cizí gen pod kontrolu CaMV 53S promotoru, jako translační fúze se signálním peptidem LeB4 (N-konec) a ER retenčním signálem KDEL (C-konec). Transport polypeptidu scFv-antichinmeraku do endoplazmatického retikula umožnil stabilní akumulaci velkých množství fragmentu aktivní protilátky. Po sklizení listového materiálu se řezy zmrazily na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1), lyofilizovaly (2) nebo vysušily při teplotě místnosti (3). Z listového materiálu se získaly příslušnou extrakcí do vodného pufru solubilní proteiny a polypeptid scFv-antichinmerak se purifikoval afinitní chromatografií. Přiměřené množství purifikovaného polypeptidu scFv-antichinmeraku (zmrazený, lyofilizovaný a vysušený) se použily ke stanovení aktivity fragmentu protilátky (obr.6). Obrázek 6A ukazuje aktivitu vazby antigenu polypeptidu scFv-antichinmeraku z čerstvých (1), lyofilizovaných (2) a vysušených (3) listů. Obrázek 6B ukazuje odpovídající množství proteinu scFv-antichinmeraku (přibližně 100 ng) použitého k ELISA testu, stanovená western blot analýzou. Velikosti proteinů se standartní molekulovou hmotností jsou ukázány vlevo. Byly nalezeny přibližně stejné aktivity vazby

13.12.99

antigenu.

Příklad 8

K ukázání tolerance k herbicidu transgenních rostlin tabáku, které produkují polypeptid se schopnostmi vazby herbicidu, byly tyto rostliny tabáku ošetřeny různými množstvími acifluorfeny a chinmeraku. Ve všech případech bylo možné ukázat ve skleníku, že rostliny exprimující scFv-antiacifluorfen a scFv-antichinmerak projevují v porovnání s příslušným kontrolním stanovením toleranci k herbicidům.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob zhotovení rostliny tolerantní ke kyselině 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoové nebo kyselině 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylové, **vyznačující se tím**, že zahrnuje expresi exogenní protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-chinolin-8-karboxylovou v rostlině.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že exogenní protilátkou je fragment protilátky s jedním řetězcem.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že exogenní protilátkou je kompletní protilátka nebo z ní odvozený fragment.
4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že rostlina je jednoděložná nebo dvouděložná.
5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že rostlinou je tabák.
6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že exogenní protilátka se v rostlině konstitutivně exprimuje.

(náhradní strana)

7. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že exprese exogenní protilátky v rostlině je indukovaná..

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že exogenní protilátka se exprimuje v listech rostliny.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že exogenní protilátka se exprimuje v semenech rostliny.

10. Expresní kazeta pro rostliny, **vyznačující se tím**, že sestává z promotoru, signálního peptidu, genu kódujícího expresi exogenní protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou, ER retenčního signálu a terminátoru.

11. Expresní kazeta podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že použitý konstitutivní promotor je promotor CaMV 35S.

12. Expresní kazeta podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že gen k expresi je gen fragmentu protilátky s jedním řetězcem.

13. Expresní kazeta podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že se jako gen k expresi použije gen nebo fragment genu protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-

(náhradní strana)

chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou ve formě translační fúze s jinými funkčními proteiny, jako například enzymy, toxiny, chromofory a vazebnými proteiny.

14. Expresní kazeta podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že protilátka k expresi se získá z buňky hybridomu nebo pomocí jiných rekombinantních metod, jako například metody vystavení fagové protilátce.

15. Použití expresní kazety podle nároku 10 k transformaci dvouděložných nebo jednoděložných rostlin, které konstitutivně semenově nebo listově specificky exprimují exogenní protilátku vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxý]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou.

16. Použití podle nároku 15, kde expresní kazeta se přenesse do bakteriálního kmene a výsledné rekombinantní klony se použijí k transformaci dvouděložných nebo jednoděložných rostlin, které konstitutivně semenově nebo listově specificky exprimují exogenní protilátku vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxý]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou.

17. Použití expresní kazety podle nároku 10 jako selekčního markeru.

18. Použití rostliny, která obsahuje expresní kartu podle nároků 10 až 14 k získání protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxý]-2-nitrobenzoovou nebo

(náhradní strana)

kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou.

19. Způsob transformace rostliny **vyznačující se tím**, že se genová sekvence kódující protilátku vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou vsune do rostlinné buňky, do kalusové tkáně, do celé rostliny a protoplastů rostlinných buněk.

20. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že transformace se provede pomocí agrobakterie, zvláště druhu *Agrobacterium tumefaciens*.

21. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že transformace se provede pomocí elektroporace.

22. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že transformace se provede pomocí metody vstřelování částic.

23. Způsob produkce protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou, **vyznačující se tím**, že se provede exprese genu kódujícího pro takovou protilátku v rostlině nebo buňkách rostliny, a následně se izoluje protilátka.

24. Rostlina obsahující expresní kazetu podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že tato expresní kazeta poskytuje

(náhradní strana)

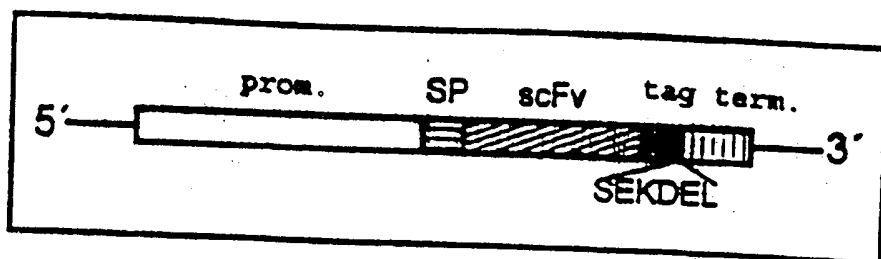
toleranci ke kyselině 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoové nebo kyselině 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylové.

25. Způsob potlačování růstu nežádoucích rostlin v transgenních užitkových rostlin resistentních ke kyselině 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoové nebo kyselině 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylové, **vyznačující se tím**, že zahrnuje použití herbicidů, kterými je kyselina 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoová nebo kyselina 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylová, proti kterým užitková rostlina vytváří protilátky vážící kyselinu 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoovou nebo kyselinu 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylovou.

26. Protilátka s vysokou vazebnou afinitou ke kyselině 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoové, **vyznačující se tím**, že se vyrobí podle nároku 23.

27. Protilátka s vysokou vazebnou afinitou ke kyselině 7-chlor-3-methylchinolin-8-karboxylové, **vyznačující se tím**, že se vyrobí podle nároku 23.

Obr. 1



-  promotor CaMV 35S
-  signální peptid LeB4
-  c-myc-tag

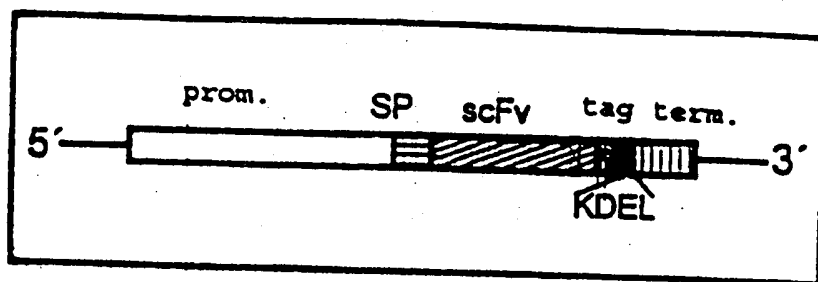
-  terminátor CaMV 35
-  Fv s jedním řetězcem

13.12.99

PV1999-3390

8/3/01

Obr. 2



promotor CaMV 35S



signální peptid LeB4



c-myc-tag



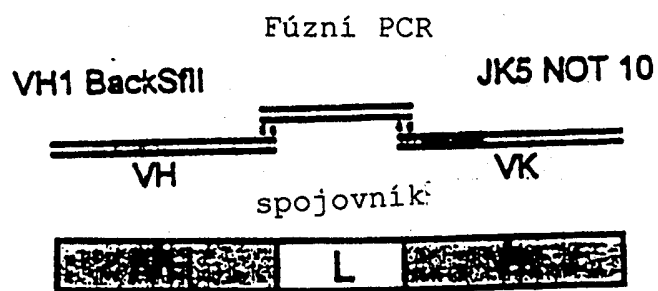
terminátor CaMV 35



Fv s jedním řetězcem

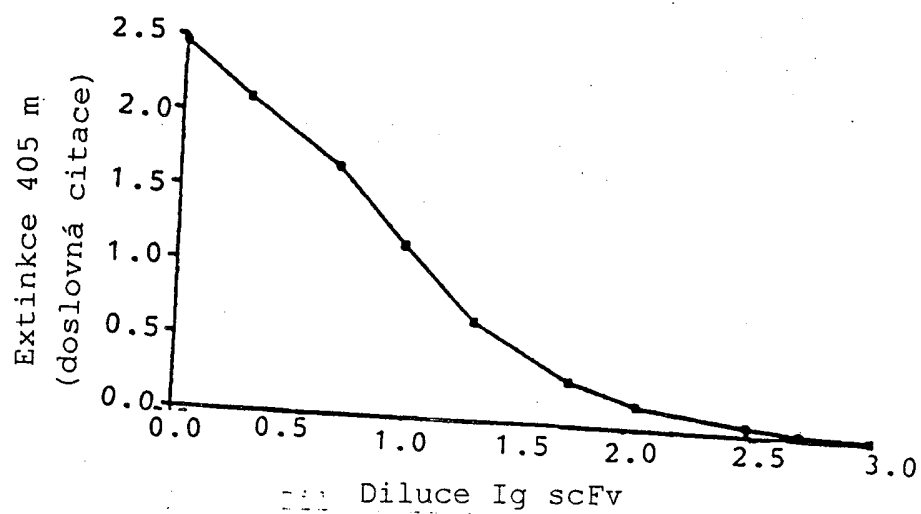
13.12.99

Obr. 3

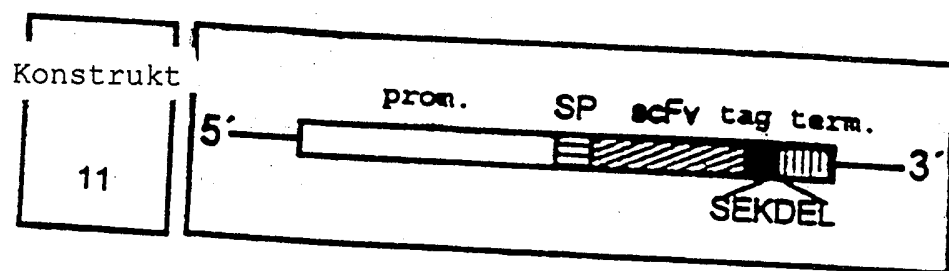


13.12.99

Obr. 4



Obr. 5



□ promotor LeB4

▨ signální peptid LeB4

▤ c-myc-tag

■ terminátor CaMV 35

■ Fv-ox s jedním řetězcem

13.12.99

Obr. 6

