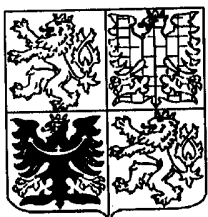


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 31.05.93
(32) 01.06.92
(31) 92/891598
(33) US
(40) 19.01.94

(21) 1030-93

(13) A3

5(51)

C 12 N 7/00
C 12 N 15/10
C 12 N 15/33
C 12 N 15/66
C 12 N 15/68
C 12 N 15/79
C 12 N 15/85

(71) AMERICAN CYANAMID COMPANY, Wayne, New Jersey, US;

(72) Brennan Lynn Ann, Lawrenceville, New Jersey, US;

(54) **Rekombinantní hmyzí virus s omezenou schopností šířit se v životním prostředí na hostitele a způsob jeho výroby**

(57) Rekombinantní neinfekční hmyzí virus se změněným genetickým základem, jehož funkčnost se obnoví genovou komplementací, čímž se opět připraví forma viru infekční pro hmyz. Dále je popsána inserce heterologního genu do virového genomu, přičemž touto insercí se docílí produkce látky, s potlačujícími nebo modifikačními účinky pro hmyz, tímto virem a tím se zlepší bioinsekticidní účinek a genetická stabilita žádaných vlastností. Rekombinantní hmyzí virus má omezenou schopnost šířit se v životním prostředí z hostitele na hostitele.

Rekombinantní hmyzí virus s omezenou schopností šířit se v životním prostředí z hostitele na hostitele a způsob jeho výroby

Oblast techniky

Tento vynález se týká neinfekčního hmyzího viru se změněným genetickým základem, jehož funkčnost se obnoví genovou komplementací, čímž se opět připraví forma viru, infekční pro hmyz. Tento vynález se dále zabývá inzercí heterologního genu do virového genomu, přičemž touto inzercí se dosáhne toho, že virus produkuje látku s potlačujícími nebo modifikačními účinky na hmyz a tím se zlepší bioinsekticidní účinek a genetická stabilita žádaných vlastností.

Dosavadní stav techniky

V tomto popisu se používají následující zkratky:

A. cal. - *Autographa californica*

AcMNPV - jaderný polyedrální virus *Autographa californica*

bp - páry bází

ECV - extracelulární virus

GV - granulózní virus

kD - kilodaltony

MOI - multiplicita infekce

NPV - jaderný polyedrální virus

OB - okluzní těleso

OV - okludovaný virus

PCR - řetězová polymerační reakce

PDV - virus odvozený od polyedrálního viru

p.i. - po infekci

PIB - polyedrální inkluzní těleso (známé také jako OB - okluzní těleso)

- 5'UTR - sekvence mRNA nebo genová sekvence odpovídající oblasti, která začíná od startovního místa transkripce genu a pokračuje až k poslední bázi nebo poslednímu páru bází, která (který) předchází iniciační kodón pro syntézu proteinu
- 3'UTR - sekvence mRNA nebo genová sekvence odpovídající oblasti, která začíná od první báze nebo prvního páru bází za terminačním kodónem pro syntézu proteinu a pokračuje až k poslední bázi kódované genem na 3'konci mRNA
- (+)-vlákno - vlákno DNA genu a jeho lemující sekvence, které má stejný smysl čtení jako RNA, která je od tohoto genu odvozena
- (-)-vlákno - vlákno DNA genu a jeho lemující sekvence, které je komplementární k (+)-vlákně.

Vynález se vztahuje na všechny hmyzí viry, včetně DNA a RNA virů. Mezi DNA viry se zahrnují entomopox viry (EPV) a viry čeledi Baculoviridae, jako jsou jaderné polyedrální viry (NPV) a granulózní viry (GV) a podobně. Mezi RNA viry se zahrnují togaviry, flaviviry, picornaviry, cytoplazmické polyedrální viry (CPV) a podobně. Podčeleď dvouvláknových DNA virů Eubaculovirinae obsahuje dva rody, viry typu NPV a viry typu GV, které jsou zvláště užitečné pro biologickou kontrolu, protože ve svém životním cyklu vytvářejí okluzní tělesa (OB).

V bezobratlých živočiších byla zjištěna přítomnost více než 400 druhů baculovirů. Jaderný polyedrální virus *Autographa californica* (AcMNPV) je prototypem viru čeledi Baculoviridae, který působí na mnoho hostitelů. AcMNPV virus byl původně izolován z druhu nočního motýla *Autographa californica* (*A. cal.*), z larválního stadia (ve svém dospělém stadiu je tento druh noční můra). Larvy druhu *A. cal.* jsou obecně známé jako housenky žijící na vojtěšce. Virus AcMNPV

napadá 12 čeledí a více než 30 druhů hmyzího řádu Lepidoptera (motýli) /Granados, R. R., a Federici, B. A., The Biology of Baculoviruses (Biologie baculovirů) I, 99 (1986)/. Není známo, že by tento virus účinně infikoval jakýkoliv jiný druh mimo tento řád.

Použití baculovirů jako bioinsekticidů je velmi slibné. Jednou z hlavních překážek, která brání jejich širokému použití v zemědělství, je časová prodleva mezi infikováním hmyzu a jeho smrtí. Tato prodleva může trvat několik dnů až několik týdnů. Během této doby se hmyz stále živí a tím způsobuje na rostlinách další škodu. Řada vědců se tento nedostatek snažila překonat vložением heterologního genu do virového genomu tak, aby se v napadeném hmyzu exprimovala řídící nebo pozměňující látka pro hmyz, jako je toxin /Tomalski, M. D., a Miller, L. K., Nature, 352, 82-85 (1991), Federici, B. A., In Vitro, 28, 50A (1992), Martens, J. W. M., a další, App. & Envir. Microbiology, 56, 2764-2770 (1990)/, neuropeptid a hormon /Menn, J. J., a Borkovec, A. B., J. Agric. Food Chem., 37, 271-278 (1989), Eldridge, R., a další, Insect Biochem., 21, 341-351 (1992)/, nebo enzym /Hammock, B. D., a další, Nature, 344, 458-461 (1990)/.

Genové inženýrství poskytuje prostředky na překonání technických překážek komerčního využití virů jako bioinsekticidů, avšak zároveň roste pocit, že zde může být další potenciální překážka bránící jejich širokému přijetí. Zejména se jedná o předpoklad, že uvolnění těchto geneticky manipulovaných virů do životního prostředí může mít nepředvídatelné následky pro ekosystém, ve kterém se tyto viry replikují a šíří /Williamson, M., Nature, 353, 394 (1991), Hammock, B., Nature, 355, 119 (1992)/. Tento předpoklad by se až dosud mohl vztahovat na všechny rekombinantní hmyzí viry, vytvořené pro biologické potlačování hmyzu, protože všechny tyto viry jsou schopné

přenosu z hmyzu na hmyz. Proto je potřeba vytvořit rekombinantní viry specifické pro hmyz, které mají sníženou schopnost pro přenos z hmyzu na hmyz (z hostitele na hostitele) po svém uvolnění do životního prostředí.

Životní cyklus baculovirů, ukázaný na příkladu viru AcMNPV, se skládá ze dvou stadií. V každém stadiu životního cyklu má virus specifickou formu: extracelulární virové partikule (ECV), které nejsou okludované a okludované virové partikule (OV) /Luckow, V. A., a Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988), Miller, L. K., Ann. Rev. Microbiol., 42, 177-199 (1988)/. Extracelulární i okludované virové formy mají stejný genom, ale vykazují odlišné biologické vlastnosti. Zrání každé z obou dvou forem viru je řízeno separátními sadami virových genů, přičemž některé z těchto sad jsou jedinečné pro každou formu.

Ve své přirozeně se vyskytující podobě, infekční pro hmyz, se pomnožené viriony nacházejí zabalené v parakrystalické proteinové matrici a jsou známé jako okluzní těleso (OB), nebo také polyedrální inkluzní těleso (PIB). Proteinové virové okluze se nazývají polyedry, mnohostěny (jednotné číslo je polyedr, mnohostěn). Hlavním strukturním proteinem virových okluzí, který je kódovaný virem, je polyhedrin, o molekulové hmotnosti 29 kD /Luckow, V. A., a Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988), Smith, G. E., a Summers, M. D., US patent č. 4 745 051/. (Podobně viry GV vytvářejí OB, které jsou složeny zejména z granulinu, spíše než z polyhedrinu.)

Virové okluze jsou důležitou částí přirozeného životního cyklu baculovirů, poskytující prostředek pro horizontální přenos (z hmyzu na hmyz) mezi susceptibilními hmyzími druhy. V životním prostředí susceptibilní hmyz (obvykle v larválním stadiu) požije virové okluze z

kontaminovaného zdroje potravy, jako například z rostliny. Krystalické okluze se v trávicím traktu susceptibilního hmyzu rozpadnou a tím se uvolňují infekční virové částice. Tyto viry odvozené od polyedrálních virů (PDV) napadají tkáňové buňky vnitřností a replikují se v nich /Luckow, V. A., a Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988)/.

Virové částice pravděpodobně vstupují do buňky endocytosou nebo fúzí a virová DNA se v buňce vyskytuje nezabalená v jaderném póru nebo v jádře. Replikace virové DNA se v buňce objeví do šesti hodin po vstupu viru. V době do 10 až 12 hodin po infekci (p.i.) se sekundární infekce rozšíří do jiných hmyzích tkání pučením extracelulárního viru (ECV) z povrchu buňky. ECV forma viru je zodpovědná za šíření viru z buňky do buňky v infikovaném hmyzím jedinci, stejně jako za přenos infekce v buněčné kultuře.

V pozdější fázi infekčního cyklu (12 hodin p.i.) lze v infikovaných buňkách zjistit protein polyhedrin. Teprve po uplynutí doby 18 až 24 hodin p.i. se v jádře infikované buňky protein polyhedrin seskupuje a virové částice se zabalí do proteinových okluzí. Během 4 až 5 dnů s postupem lyze buněk narůstá počet virových okluzí do velkých hodnot. Tyto polyedry nemají aktivní úlohu při šíření infekce v larvě. Viry v ECV formě se množí a šíří v hemolymfě a tím způsobují smrt larvy /Luckow, V. A., a Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988), Miller, L. K., Ann. Rev. Microbiol., 42, 177-199 (1988), Smith, G. E., a Summers, M. D., US patent č. 4 745 051/.

Když infikovaná larva zahyne, v rozkládající se tkáni zůstanou miliony polyedrů, kdežto ECV formy viru se rozloží. Cyklus se opakuje, když je jiná larva vystavena vlivu těchto polyedrů například tím, že požije kontaminované

rostliny nebo jinou kontaminovanou potravu /Luckow, V. A., a Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988)/.

Souhrnem lze říci, že okludované formy viru zodpovídají za počáteční infikování hmyzu prostřednictvím trávicího ústrojí a také za stabilitu viru v životním prostředí. PDV formy viru nejsou v zásadě infekční při injekčním podávání, ale jsou vysoce infekční při orálním podávání. Neokludované formy viru (tj. ECV formy) zodpovídají za sekundární infekci a přenos infekce mezi buňkami. ECV formy viru jsou vysoce infekční pro buňky v kultuře nebo pro vnitřní hmyzí tkáňové buňky, jestliže jsou do nich vpraveny injekcí, ale nejsou v zásadě infekční při orálním podávání.

Použití rekombinantních baculovirů, které exprimují cizí proteiny, toxické pro hmyz, je usnadněno tím, že tyto viry nejsou patogenní pro obratlovce nebo rostliny. Kromě toho mohou baculoviry obecně napadat úzký okruh hostitelů. Mnoho kmenů parazituje pouze na jednom hmyzím druhu nebo na několika hmyzích druzích.

Nejzkoumanějším baculovirem je AcMNPV virus. Je známo, že virus AcMNPV infikuje 12 čeledí a více než 30 druhů hmyzího řádu Lepidoptera (motýli) /Granados, R. R., a Federici, B. A., The Biology of Baculoviruses (Biologie baculovirů) I, 99 (1986)/. Není známo, že by tento virus mohl účinně infikovat jakýkoliv jiný druh mimo tento řád. Jak veřejnost, tak různé úřady diskutovaly o možných následcích, které by mělo uvolnění kmene AcMNPV, obsahujícího cizí sekvenci DNA /Williamson, M., Nature, 353, 394 (1991), Hammock, B., Nature, 355, 119 (1992)/. Diskuse se týká možnosti, že by se manipulovaný virus mohl rozšířit i na jiné druhy řádu Lepidoptera, proti kterým nebyl určen. Dalším zvažovaným faktorem je známá stabilita

těchto virů v životním prostředí.

Proto je potřeba vytvořit rekombinantní virus, specifický pro určitý hmyz, s omezenou schopností šířit se z hmyzu na hmyz (z hostitele na hostitele). Tyto viry by měly být schopné infikovat hmyz, ale měly by mít významně sníženou schopnost přenosu z hmyzu na hmyz a tím i schopnost udržet se v životním prostředí.

Podstata vynálezu

Vynález se týká konstrukce a pěstování rekombinantních virových kmenů proti hmyzu, které mají sníženou schopnost šířit se z hmyzu na hmyz, tj. mají sníženou schopnost přenosu mezi hostiteli v životním prostředí. Viry čeledi Baculoviridae jsou zvláště vhodné pro konstrukci takových kmenů, vzhledem ke dvěma stádiím svého životního cyklu, jak je to popsáno výše v textu.

Tyto virové kmeny se získají tak, že se nejprve změní genetický základ takovým způsobem, že virus se stane pro hmyz neinfekčním. Termín genetický základ neznamená v kontextu tohoto vynálezu pouze geny, které kódují trans-působící látky, jako jsou RNA nebo proteinové molekuly, ale zahrnuje i cis-působící elementy nebo regulační sekvence, jako jsou transkripční enhancery, promotory, jiné transkripční, translační a replikaci genomu řídící elementy a balicí sekvence virové DNA (nebo RNA).

Změna genetického základu může mít podobu delece, posunu čtecího rámce, inserce, přesmyku, bodové mutace nebo jiného porušení funkce genu. Jiné formy změny zahrnují způsoby, které zabraňují fungování viru, jako je potlačení transkripce nebo translace, použití antikodómové RNA, inserce přídatného genového elementu a inserce přídatného

regulačního elementu, jako je například kvasinková aktivační sekvence, nacházející se před cílovým genem, která vyžaduje přítomnost GAL 4 proteinu pro svoji aktivitu (UAS_{GAL}).

Cíle obnovit infekčnost rekombinantního viru, přičemž přenos z hostitele na hostitele je významně snížen, se dosáhne komplementací genů produktem nebo funkcí, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní.

Tento vynález zahrnuje různé způsoby produkce infekční podoby rekombinantního hmyzího viru komplementací genů, a to: (1) produkci infekčního rekombinantního viru v kultuře tkáňových buněk hmyzu, transfekovaných fragmentem DNA, poskytujícím produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní; (2) produkci infekčního rekombinantního viru v liniích hmyzích buněk, které byly stabilně transformovány fragmentem DNA, poskytujícím produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní; (3) produkci infekčního rekombinantního viru v transgenních hmyzích jedincích, kteří obsahují fragment DNA, poskytující produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní.

V závislosti na poskytnutém produktu nebo funkci může být nutné nebo žádoucí použít heterologní virový nebo buněčný promotor pro řízení exprese daného DNA fragmentu. Použití promotoru může být vynuceno ohledy na dávkování nebo dobu.

Hmyzí buňky používané pro způsob přípravy infekčního rekombinantního viru podle způsobů (1) a (2) a transgenní hmyzí druhy podle způsobu (3) fungují tedy jako "pomocníci" při obnově infekčnosti viru. Virové částice (viriony) připravené podle těchto způsobů způsobují infekci, jsou-li v přírodě požitý hmyzem. Viriony utvořené v

infikovaných larvách jsou defektní, protože nejsou komplementovány, a infekce se proto nešíří snadno na jiné hmyzí jedince. V nepřítomnosti koinfikujícího divokého viru proto životní cyklus rekombinantního viru končí po této jediné infekci.

Při přednostní aplikaci tohoto vynálezu se do virového genomu vloží gen, kódující látku, která má řídicí nebo modifikační účinky na hmyz. Tento gen se vloží na jakékoliv vhodné místo do genomu změněného viru. Látkami, které mají řídicí nebo modifikační účinky na hmyz, mohou být toxiny, neuropeptidy a hormony a enzymy. Expres takové látky zvyšuje bioinsekticidní účinek.

Zejména vhodné je, když se tento gen vloží přímo do místa změny genetického základu, které zodpovídá za sníženou schopnost přenosu z hostitele na hostitele, nebo na pozici, která s tímto místem sousedí. Vložení heterologního genu do místa změny genetického základu nebo do jeho blízkosti zabraňuje nebo velmi omezuje rekombinaci genů, která by mohla dát vzniknout formě daného viru, mající jak fenotyp divoké podoby viru, tak gen s potlačujícími účinky na hmyz nebo modifikační gen pro přenos z hostitele na hostitele.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 zobrazuje lineární mapu známých baculo-virových genů AcMNPV genomu /Blissard, G. W., a Rohrmann, G. F., Ann. Rev. Entomol., 35, 127-155 (1990)/.

Obr. 2 ukazuje detail konstrukce plazmidu p74-1, který obsahuje deleci v p74 genu z viru AcMNPV.

Obr. 3 ukazuje detail delece v p74 genu (v plazmidu p74) z viru AcMNPV, z kmene A4000.

Obr. 4 ukazuje restriční mapu části expresního vektoru ze sérií PMEVI, na které je zobrazen promotor, poly-linker a oblast 3'UTR.

Následuje podrobný popis vynálezu.

Výsledkem genetické manipulace hmyzího viru se sníženou schopností šířit se z jednoho hmyzího jedince na jiného je zvýšená rychlost vymizení infekčního viru z prostředí, přesahující rychlosti přirozených procesů abiotické a biotické degradace. Proto se manipulovaný virus sám neprosadí v životním prostředí.

Tento vynález se týká všech hmyzích virů včetně DNA a RNA virů. DNA viry zahrnují viry obsahující zabalenou dvouvláknovou DNA, jako například (nejprve uvedena čeleď, potom druh) Entomopoxvirinae (poxvirus řádu coleoptera (brouci)), Eubaculovirinae (Autographa californica MNPV; Heliocoverpa zea SNPV), Nudibaculovirinae (Heliocoverpa zea NOB), Ichnovirus (Campoletis sonorensis virus), a Bracovirus (Cotesia melanoscela virus) a také viry obsahující nezabalenou dvouvláknovou DNA, jako například Iridoviridae (Chilo iridescent virus), a viry obsahující nezabalenou jednovláknovou DNA, jako například Parvoviridae (Galleria densovirus).

RNA viry zahrnují viry, obsahující zabalenou dvouvláknovou RNA, jako například Togaviridae (Sindbis virus), Bunyaviridae (řepný virus króucení listů) a Flaviviridae (Wesselbron virus) a také viry obsahující nezabalenou dvouvláknovou RNA, jako například Reoviridae (Corriparta virus), a Birnaviridae (Drosophila X virus), a také viry obsahující nezabalenou jednovláknovou RNA, jako například Picornaviridae (Cricket paralysis virus), Tetraviridae

(Nudaurelia beta virus) a Nodaviridae.

Podčeled virů obsahujících dvouvláknovou DNA, Eubaculovirinae, obsahuje dva rody, jaderné polyedrální viry (NPV) a granulózní viry (GV), které jsou zvláště užitečné pro biologické potlačování, protože ve svém životním cyklu tvoří okluzní tělesa. Příklady NPV virů jsou Lymantria dispar NPV (NPV virus červené můry), Autographa californica MNPV, Anagrapha falcifera NPV (NPV virus píďalky celerové), Spodoptera littoralis NPV,, Spodoptera frugiperda NPV, Heliothis armigera NPV, Mamestra brassicae NPV, Choristoneura fumiferana NPV, Trichoplusia ni NPV, Helicoverpa zea NPV, Rachiplusia ou NPV, atd. Příklady GV virů jsou Cydia pomonella GV (GV virus zavíječe jablečného), Pieris brassicae GV, Trichoplusia ni GV, Artogeia rapae GV, Plodia interpunctella GV (virus kukuřičné můry), atd. Příklady entomopox virů jsou Melolontha melonotha EPV, Amsacta moorei EPV, Locusta migratoria EPV, Melanoplus sanguinipes EPV, Schistocerca gregaria EPV, Aedes aegypti EPV, Chironomus luridus EPV, atd.

Použitím tohoto vynálezu se docílí ochrana zemědělských plodin, stromů, keřů, sadů a okrasných rostlin před útokem hmyzu, zvláště hmyzu z řádů Lepidoptera, Orthoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Homoptera, Hemiptera a Coleoptera.

Ačkoliv vynález je ilustrován na příkladu viru NPV (AcMNPV) pro druh Autographa californica, je samozřejmé, že zde popsané náměty se dají použít pro všechny shora uvedené hmyzí viry. Dále se předpokládá, že tento vynález bude velmi užitečný při zlepšování nových hmyzích virů, které dosud nebyly identifikovány a klasifikovány v literatuře.

Výsledkem infekce virem AcMNPV je nejprve tvorba pučící formy viru, která je známá jako ECV. ECV forma způsobuje šíření viru z buňky do buňky v napadeném hmyzím jedinci a také během růstu v buněčné kultuře. V případě virů NPV začne infikovaná buňka v pozdější fázi infekčního cyklu tvořit PDV formu viru. PDV forma je zabalená v krystalickém okluzním tělese (OB), které se také někdy nazývá polyedrál ní inkluzní těleso (PIB). (Podobně GV viry tvoří OB, které se skládají hlavně z proteinu granulinu, spíše než z polyhedrinu.) Tato PDV forma viru způsobuje počáteční infekci hmyzu vnitřnostmi a také stabilitu viru v životním prostředí.

Taková změna funkce, jež způsobuje tvorbu intaktních infekčních OB, která neovlivňuje pučící formu viru (ECV), je zvláště užitečná.

Ve viru AcMNPV byly nalezeny takové mutace, /Partington, S., a další, Virology, 175, 91-102 (1990)/. Po provedení mnoha mutačních pokusů byly identifikovány genové lokusy, které způsobují tvorbu pučící formy viru, ale nezodpovídají za tvorbu intaktních infekčních polyedrů. Jedním z nejzajímavějších potenciálně užitečných lokusů, který byl identifikován, je p74 gen, obsažený v Hind III fragmentu "P" genomu viru AcMNPV /Kuzio, J., a další, Virology, 173, 759-763 (1989)/. p74 je protein produkovaný v pozdější fázi infekce baculovirem a v relativně malých množstvích /Kuzio, J., a další, Virology, 173, 759-763 (1989)/.

Homologní sekvence p74 genu byly identifikovány v jiných NPV virech, včetně Choristoneura fumeiferana NPV /Hill, J. E., a další, Biochimica et Biophysica Acta, 1172, 1-2 (1993)/ a Orgyia pseudotsugata NPV /Leisy, D. J., a další, Virology, 153, 157-167 (1986)/. Homologní sekvence

genu p74 by se měla vyskytovat ve všech druzích rodu NPV. Vzhledem k podobnostem mezi životními cykly NPV virů a životními cykly virů příbuzného rodu granulózních virů (GV) je velmi pravděpodobné, že tyto GV viry obsahují gen s vlastnostmi podobnými genu p74.

Výsledkem rozsáhlých delecí, kterými se odstraní tento p74 gen a sousední p10 gen, je virus tvořící polyedry, které však, jsou-li součástí potravy larev, nepůsobí infekčně. Jelikož výsledkem delece pouze v genu p10 je tvorba orálně infekčních polyedrů, předpokládá se, že uvedená změna fenotypu je způsobena delecí genu p74 /Kuzio, J., a další, Virology, 173, 759-763 (1989)/.

Jak je popsáno dále v textu, v příkladu 1, byl vytvořen transferový vektor (pojmenovaný Δ p74-1), který po rekombinaci s genomem viru divokého typu způsobí delecí v samotném p74 genu (Δ p74) (obr. 3). Vzorky E. coli kmene HB101, nesoucí tento transferový vektor Δ p74-1, byly uloženy 21. května 1992 v Americké sbírce typů kultur, (American Type Culture Collection) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, a dostaly ATCC přírůstkové číslo 68 988. 21. května 1992 byly v této sbírce uloženy také vzorky AcMNPV kmene označeného A4000 (v tomto kmeni je gen p74 poškozen delecí), který dostal ATCC přírůstkové číslo VR 2373.

Je potvrzeno a popsáno v příkladu 2 dále v textu, že je to právě delece DNA segmentu, kodujícího p74 gen, která způsobuje tvorbu PIB těles neinfekčních pro larvy, které je požíjí. Stále se však tvoří pučící forma viru, a ta působí infekčně, je-li injekcí vpravena do hemocoelu hmyzu.

Jednoduchá delece DNA segmentu není jediným typem změny, používaným pro porušení funkce cílového genetického

základu viru. Pro účely tohoto vynálezu termín genetický základ neznamena pouze geny, které kódují trans-působící látky, jako jsou RNA nebo proteinové molekuly, ale zahrnuje i cis-působící elementy nebo regulační sekvence, jako jsou transkripční enhancery, promotory, jiné transkripční, translační a replikaci genomu řídící elementy a balící sekvence virové DNA (nebo RNA).

Změna může mít také podobu posunu čtecího rámce, inserce, přeskupení genů, bodové mutace nebo jiného porušení funkce genu. Do tohoto výčtu spadá posun čtecího rámce, který způsobí buď předčasné ukončení tvorby proteinu nebo tvorbu změněného nefunkčního proteinu. Dále tento vynález zahrnuje inserci terminačního kodónu do oblasti genu kódující protein a vsazení genu pro vhodnou supresorovou tRNA do pomocné "helper" buněčné linie.

Jiné formy změny genetického základu zahrnují způsoby, které zabraňují fungování viru, jako je potlačení transkripce nebo translace, použití antikodónové RNA, inserce přídatného genového elementu do virového genomu a poskytnutí žádaného regulačního elementu pro trans-působící látky. Příkladem tohoto způsobu je použití kvasinkové aktivační sekvence, uložené před cílovým genem, závislé na GAL 4 proteinu (UAS_{GAL}).

Vložení této kvasinkové sekvence, aktivované proteinem GAL 4 (UAS_{GAL}), před cílový virový gen způsobí, že transkripce virového genu je závislá na přítomnosti GAL 4 proteinu. Pomocná buněčná linie (helper) obsahuje kódující oblast pro GAL 4 gen pod kontrolou jednoho z heterologních promotorů, popsaných dále v textu. Tento vynález zahrnuje i jiné možné UAS elementy, jako jsou například UAS elementy vyskytující se při párování (mating) kvasinek. Dále tento vynález zahrnuje sekvence regulačních elementů, které

vyžadují navázání proteinu pro svou aktivaci, jako jsou receptory pro steroidy a jejich vazná místa v DNA.

Vynález se také vztahuje na použití promotorů, které fungují pouze za přítomnosti specifických proteinů. Příkladem takového promotoru je T7 promotor bakteriofágu T7, který pro zahájení transkripce vyžaduje T7 specifickou RNA polymerasu. Vložení T7 promotoru před p74 gen na místo jeho přirozeného promotoru způsobí, že transkripce virového genu je závislá na přítomnosti T7 RNA polymerasy. Buněčná linie helper pro tento virus obsahuje gen pro T7 RNA polymerasu pod kontrolou heterologního promotoru, jako je IE-1 virový promotor.

Kromě genu p74 a jeho funkčních homologů se mohou změnit funkce přídavných genů, což způsobí zamezení šíření rekombinantního viru (například 14). Z tohoto hlediska jsou zvláště užitečné geny ovlivňující funkce, nezbytné pro tvorbu intaktních infekčních OB. Příklady těchto genů jsou genový element, řídící regulaci přepínání (switch) z tvorby ECV na tvorbu OB, gen kódující funkci žádanou pro přímé seskupování nebo zrání virové částice a gen kódující strukturní protein virové částice.

Dalšími příklady genů, které se mohou změnit podle tohoto vynálezu, jsou geny, které tvoří FP (few polyhedra, tj. malé množství polyedrů) mutanty, jako je 25K gen /Beames, B., a Summers, M. D., Virology, 168, 344-353 (1989)/, a také geny, jejichž funkce po jejich porušení vede ke vzniku žádaného fenotypu, jako jsou virové transkripční faktory specifické pro fungování pozdních a velmi pozdních genů, geny pro polyedrální obalové proteiny (o hmotnosti 32 až 36,5 kD), gen pro PDV protein, který interaguje s receptorem v trávicím ústrojí a je zodpovědný za počáteční infikování buněk trávicího ústrojí, gen nebo genový element

zodpovědný za seskupování PDV nukleokapsidu, gen zodpovědný za organizaci polyedru a gen kódující NPV funkční ekvivalent virového zesilovacího (enhancing) faktoru /Gallo, L. G., a další, J. Invertebrate Path., 58, 203-210 (1991)/, který byl nalezen v GV virech.

Ačkoliv pro změnu genetického základu je také možné použít gen pro polyhedrin, existují pro toto použití významná praktická omezení. Výsledkem vysoké rychlosti transkripce/translace genu pro polyhedrin, spojené s velkou amplifikací virového genomu, která se odehrává při replikaci viru, je fakt, že množství proteinu polyhedrinu dosahuje 50 až 75 % celkového množství barvitelných proteinů v napadené buňce. Toto velké množství proteinů může zpochybnit možnost toho, aby omezené množství extravirových kopií genu pro polyhedrin kompenzovalo deletovaný virový gen pro polyhedrin. Avšak komplementace polyhedrin-minus viru (viru netvořícího polyhedrin) by se měla získat s použitím regulačních elementů nebo faktorů, které by se pouze měly dodat v menším množství. Příkladem je manipulace virového genu pro polyhedrin tak, aby obsahoval gen pro supresorovou tRNA, nebo změna regulačních elementů genu pro polyhedrin a pěstování viru ve vhodné buněčné linii helper nebo hmyzím kmeni, jak je to popsáno výše v textu.

Zdá se, že na rozdíl od polyhedrinu je p74 protein žádán v mnohem menším množství. Ačkoliv se gen p74 přepisuje v pozdější fázi infekce virem, kdy virový genom je již výrazně amplifikován, hladina p74-specifické mRNA je poměrně nízká. Mělo by tedy být možné manipulovat p74 konstrukt tak, aby jen omezené množství extravirových kopií mohlo zajistit dostatečné fungování genu p74 pro komplementaci viru, aby se docílila jeho orální infekčnost.

Vynález je demonstrován na příkladu viru AcMNPV.

Gen vykazující homologní funkci s genem p74 by měl být přítomen ve všech virech patřících do NPV a GV skupin baculovirů. V druzích baculovirů, které jsou blízce příbuzné viru AcMNPV, se dají identifikovat homology p74 genu pomocí hybridizace s p74 fragmentem viru AcMNPV za podmínek snížené stringence. Tento přístup je zejména vhodný, protože dostupné údaje ukazují, že p74 gen je jedním z nejvíce zachovaných baculovirových genů /Hill, J. E., a další, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1172, 1-2 (1993)/. Pro vzdáleněji příbuzné viry, jako jsou GV viry, se tento přístup nemůže použít. Alternativní způsob identifikace genů, kódující homologní funkci k identifikovanému genu viru AcMNPV, je popsán v příkladu 14. Při tomto souboru pokusů se AcMNPV kmen se známým genetickým defektem transfekuje společně s fragmenty virového genomu, který je předmětem zájmu. Komplementace defektu identifikuje gen, který je předmětem zájmu. Tento způsob se úspěšně použil při identifikaci genu v granulózním viru *Cydia pomonella* s funkcí homologní k p35 apoptose, inhibující gen viru AcMNPV /Crook, N. E., a další, *J. Virology*, 67, 2168-2174 (1993)/.

Mohou se také použít jiné způsoby identifikace funkcí dalších nezbytných pozdních genů. Passarelli a Miller /Passarelli, A. L., a Miller, L. K., *J. Virology*, 67, 2149-2158 (1993)/ nedávno publikovali způsob identifikace transkripčních faktorů pro pozdní/velmi pozdní geny. Při tomto způsobu se fragmenty AcMNPV virového genomu transfekují společně s konstrukty, které pro řízení exprese CAT genu používají pozdní nebo velmi pozdní virové promotory. Fragmenty AcMNPV genomu, které obsahují geny účastnící se při normální transkripci virových pozdních nebo velmi pozdních genů, se identifikují podle své stimulace CAT aktivity nad obvyklou úroveň.

Pro hmyz se infekční forma viru vytvoří dodáním

změněné genové funkce technikou genové komplementace. Tato pro hmyz infekční forma změněného viru se nepřenáší snadno z hostitele na hostitele. Genová komplementace poskytne genu schopnost konvertovat mutantní fenotyp na fenotyp divokého typu v trans-podmínkách.

Tento vynález zahrnuje různé způsoby produkce infekční formy rekombinantního hmyzího viru, jmenovitě: (1) produkci tohoto viru v kultuře hmyzích tkáňových buněk transfekovaných fragmentem DNA, poskytujícím produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní; (2) produkci tohoto viru v liniích hmyzích buněk stabilně transfekovaných fragmentem DNA, poskytujícím produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní; (3) produkci tohoto viru v transgenních hmyzích jedincích obsahujících fragment DNA, poskytující produkt nebo funkci, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní. Buněčná linie použitá při způsobu (1) nebo (2) poskytuje chybějící funkci a tak slouží jako buněčná linie helper.

Například p74 gen viru AcMNPV se deletuje, jak je popsáno výše v textu. p74 gen divokého typu komplementuje deficienci změněného viru při třech specifických uspořádáních, právě popsaných výše v textu, následujícími způsoby: (1) Virus se pěstuje v hmyzích buňkách, které obsahují extrachromosomální kopie funkčního p74 genu. Těmito extrachromosomálními kopiemi mohou být DNA fragmenty, plazmidy obsahující p74 gen nebo plazmidy schopné replikace během buněčného dělení nebo jako odpověď na virovou infekci. (2) Virus se pěstuje v linii hmyzích buněk obsahující jednu nebo více funkčních kopií p74 genu, přičemž tyto kopie jsou stabilně integrovány do buněčného genomu. (3) Virus se pěstuje v transgenních hmyzích jedincích obsahujících jednu nebo více funkčních kopií p74 genu v hmyzím genomu.

Při všech třech způsobech se funkční p74 gen může dodat z viru AcMNPV nebo z jakéhokoliv jiného jedince čeledi Eubaculoviridae, pokud je tento jedinec navrací infekčnost. Klíčovou roli hraje fakt, že funkční p74 gen je přítomen v trans-podmínkách a poskytuje látku schopnou difuze, která regeneruje fenotyp divokého typu.

Při jednom způsobu produkce komplementované formy viru se virus pěstuje v buněčné linii, která mu poskytuje chybějící funkci. Například $\Delta p74$ virus tvoří v buněčné linii, která exprimuje produkt p74 genu. Transfekcí plazmidu obsahujícího Hind III fragment "P" viru AcMNPV (hlavně se jedná o p74 gen s malým množstvím nativních lemujících sekvencí AcMNPV genomu), společně s $\Delta p74$ virem, se dosáhne přechodně regenerace infekční formy viru. Vzorky E. coli kmene HB101 nesoucího tento plazmid s označením AC0028.3, obsahující p74 gen a lemující sekvence, jak bylo právě popsáno, byly uloženy 21. května 1992 v Americké sbírce typu kultur a bylo jim uděleno ATCC přírůstkové číslo 68 987. Protože jenom 0,1 až 5,0 % buněk použitých pro tuto společnou transfekci obsahuje jak funkční p74 gen, tak $\Delta p74$ virový genom, je tento způsob v podstatě neúčinný.

Účinnějším způsobem tvorby buněčné linie helper je vložení kopie p74 genu do buňky tak, že se tento gen stabilně integruje do buněčného genomu (viz příklad 6). Tento postup byl použit pro vložení nebaculovirových genů do Sf9 linie hmyzích buněk /Jarvis, D. L., a další, Biotechnology, 8, 950-955 (1990)/. Sf9 linie hmyzích buněk (ATCC přírůstkové číslo CRL 1711) je odvozena od druhu Spodoptera frugiperda 21 (Sf21). Plazmid obsahující kopii genu, který je předmětem zájmu, se transfekuje společně s plazmidem obsahujícím selekční marker.

Selekční marker je gen, jehož exprese umožňuje

identifikaci buněk, které byly transformovány vektorem obsahujícím tento markerový gen a také gen, který je předmětem zájmu. Mezi příklady obecně užívaných selekčních markerů patří geny pro thymidinkinasu (TK) a pro hypoxanthinguaninfosforibosyltransferasu (HGPRT) a také geny, které kódují resistenci k antibiotikům, jako je neomycin a hygromycin.

Pro komplementaci se používá dvojnásobný až dvacetinásobný molární přebytek komplementární DNA k DNA obsahující selekční marker. Tento přebytek maximalizuje pravděpodobnost, že buňka, která exprimuje selekční marker, obsahuje také gen, o který je zájem. Vybraná buněčná linie musí dovolit vstup používanému viru. Při přednostním použití viru AcMNPV je takovou buněčnou linií Sf9 nebo Sf21 linie. Po transfekci se buňky pěstují za podmínek selekčního tlaku a tak se pomnoží buňky exprimující selektivní marker. Tyto pomnožené buněčné linie se podrobí výběru, jehož kritériem je schopnost těchto linií komplementovat p74 delecii v Δ p74 viru.

Tento způsob se používá pro izolaci Sf9 buněčných linií obsahujících kopie plazmidu AC0028.3, což je plazmid obsahující p74 gen, popsáný výše v textu. Vzorky buněčné linie označené Sf9 (28,3) CL-2, obsahující kopie plazmidu AC0028.3 stabilně integrované do buněčného genomu, byly uloženy 7. dubna 1993 v Americké sbírce typů kultur a dostaly ATCC přírůstkové číslo CRL 11 322. Bylo potvrzeno, jak je popsáno v příkladu 7 dále v textu, že pěstování defektního orálně neinfekčního Δ p74 viru ve shora uvedené buněčné linii vede k produkci orálně infekčního Δ p74 viru.

Komplementace se neomezuje na pěstování viru v buněčné kultuře. Stejně jako se může vytvořit buněčná linie typu helper, může se také vytvořit hmyzí kmen typu helper.

Například P element transformace druhu *Drosophila* je nyní běžně užívaný a podobný systém se může vytvořit pro jakýkoliv hmyzí druh. Kromě toho se provádí bezvektorová transformace hmyzu podobným způsobem jako bezvektorová transformace savců. Pro vytvoření hmyzích jedinců nesoucích nezbytný gen se může použít přímé injekční vpravení genu do pre-blastodermálních vajíček /Presnail, J. K., a Hoy, M. A., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 7732-7736 (1992)/ nebo balistická transformace těchto vajíček kovovými vlákny /Baldarelli, R. M., a Lengyel, J. A., Nucleic Acids Res., 18, 5903-5904 (1991)/.

Pro tvorbu produktu p74 genu stačí relativně slabý endogenní p74 promotor. Avšak může být žádoucí použít silnější nebo dříve působící promotor pro urychlení tvorby produktu p74 genu. Použití heterologního promotoru by mohlo zlepšit účinnost komplementace Δ p74 viru. Pro toto použití se hodí virové promotory jakékoliv velikosti. Příklady těchto promotorů jsou 6,9K promotor (pro základní protein), DA26 promotor, promotor pro polyhedrin, 35K promotor, 39K promotor, p10 promotor a IE-1 promotor.

Použití konstruktů s heterologními promotory, jako jsou konstrukty popsané v příkladech 4 a 5, má další výhodu. V těchto konstruktech jsou odstraněny téměř všechny homologní sekvence od 5'konce k deleci v p74 genu v A4000 Δ p74 viru popsáném v příkladu 1. Toto by mělo vysoce snížit jakoukoliv možnost homologní rekombinace, odehrávající se mezi p74 virem a p74 sekvencemi, které jsou integrované do buněčného genomu. Výsledkem této homologní rekombinace by jinak mohlo být obnovení p74 funkce a obnovení divokého fenotypu viru (viz diskuse v příkladu 7). Dalším krokem, jak snížit možnost homologní rekombinace, je zvýšit velikost delece v p74 genu Δ p74 viru tak, aby nezbyvala žádná kódující sekvence. To se snadno provede

modifikováním postupu, který je popsán v příkladu 1.

Heterologním promotorem nemusí být virové promotory. Buněčné promotory jsou také vhodné a existuje jejich neomezený výběr. Příklady takových promotorů jsou Bombyx mori aktin promotor a Drosophila melanogaster hsp 70 promotor. Dobré promotory udržují expresi na střední nebo vysoké úrovni ve vhodných hmyzích buňkách během infekce virem. Tyto charakteristiky neomezují výběr na hmyzí promotory. Těmito kritériím mohou vyhovovat různé promotory z obratlovců, kvasinek nebo z jiných tříd virů. Jakýkoliv ze shora uvedených promotorů také řídí expresi selekčního markeru.

Podle dalšího způsobu provedení tohoto vynálezu se do virového genomu vloží heterologní gen pro látku, která má potlačující nebo modifikační účinky na hmyz. Touto látkou je například toxin, neuropeptid nebo hormon nebo enzym. Zejména vhodné je, když se heterologní gen vloží přímo na místo změny genetického základu viru, což znamená, že rekombinací mezi geneticky změněným virem a superinfekčním divokým typem viru ve většině případů nevznikne virus s funkcí viru divokého typu a s vloženým heterologním genem. Do tohoto vynálezu také spadá inserce heterologního genu na místo sousedící s místem změny genetického základu viru, takže segregace heterologního genu a změněného genetického základu se vyskytne u méně než 10 % z celkového množství virových potomků. Omezení šíření geneticky manipulovaného viru se proto zachová v obou případech.

Takovými toxiny jsou například pro hmyz specifický toxin AaIT ze škorpióna Androctonus australis /Zlotkin, E., a další, Toxicon, 9, 1-8 (1971)/, toxin z roztoče druhu Pyemotes tritici /Tomalski, M. D., a Miller, L. K., Nature, 352, 82-85 (1991)/, toxin z Bacillus thuringiensis subsp.

aizawai (BTK) /Martens, J. W. M., a další, App. & Envir. Microbiology, 56, 2764-2770 (1990)/, toxin izolovaný z pavoučího jedu /Jackson, J. R. H., a Parks, T. N., US patent č. 4 925 664/ a toxin z Bacillus thuringiensis CryIVD (BTI) /Federici, B. A., In Vitro, 28, 50A (1992)/. Mezi příklady takových neuropeptidů nebo hormonů, které mohou být vhodné pro tento postup, se řadí hormon eklosion /Eldridge, R., a další, Insect Biochem., 21, 341-351 (1992)/, protoracikotropní hormon (PTTH), adipokinetický hormon, diuretický hormon a proktolin /Menn, J. J., a Borkovec, A. B., J. Agric. Food Chem., 37, 271-278 (1989)/. Příkladem takových enzymů je juvenilní hormonesterasa (JHE) /Hammock, B. D., a další, Nature, 344, 458-461 (1990)/.

Například vytvořením rekombinantního baculoviru, který má defektní nebo deletovaný p74 gen a obsahuje také heterologní gen kódující toxin vložený na místo změny p74 genu, vznikne virus se zvýšenou účinností proti cílovému hmyzu, ale neschopný snadno se přenášet z jednoho hmyzího jedince na druhého v životním prostředí.

Izoluje se AcMNPV virus, jak je popsáno dále v textu v příkladech 11 a 12, přičemž na místo delece v Δ p74 viru A4000, pod kontrolou virového DA26 promotoru, se vloží gen pro toxin AaIT ze škorpióna specifický pro hmyz. Vzorky takto vytvořeného viru, označeného A4001, byly uloženy 7. dubna 1993 v Americké sbírce typů kultur a dostaly ATCC přírůstkové číslo VR 2405. Výsledkem pěstování tohoto viru v buňkách Sf9 divokého typu je produkce orálně neinfekčních PIB (podle očekávání). Když se tento virus pěstuje v buněčné linii typu helper Sf9 (28.3) CL-2 popsané výše v textu, výsledné PIB jsou orálně infekční a infikovaný hmyz vykazuje příznaky kontraktivní paralýzy, která je charakteristická pro AaIT toxin (viz příklad 12 dále v textu).

Pěstování tohoto viru v buněčné linii nebo transgenním hmyzu, které dodají produkt funkčního p74 genu, umožní tomuto viru infikovat hmyz trávicím ústrojím. Protože však zde nenastane další komplementace, přirozené populace hmyzu produkují pouze virus defektní z hlediska orální infekčnosti. Proto v nepřítomnosti koinfikujícího viru divokého typu životní cyklus rekombinantního viru končí po této jediné infekci. To je rozdíl oproti publikovaným postupům použití baculoviru /Tomalski, M. D., a Miller, L. K., Nature, 352, 82-85 (1991)/, kde po zániku napadeného hmyzu se do prostředí uvolní OB; tyto OB jsou stráveny jiným hmyzem a životní cyklus viru se opakuje, čili přenos z hostitele na hostitele se zde vyskytuje.

Snad nejdůležitější věcí v tomto vynálezu je umístění heterologního genu pro toxin, neuropeptid nebo hormon nebo enzym přímo na místo změny virového genetického základu nebo do jeho blízkosti, což znamená, že jakákoliv homologická rekombinace mezi tímto geneticky manipulovaným virem a virem divokého typu pouze obnoví původní rodičovské genotypy.

Například inzercí genu pro toxin do deletované oblasti genu p74 se vytvoří virus s fenotypem toxin+/tvorba infekčních OB-. Rekombinací s virem divokého typu (s fenotypem toxin-/tvorba infekčních OB+) se získá jenom potomstvo s fenotypy toxin+/tvorba infekčních OB- a toxin-/tvorba infekčních OB+. Rekombinačnímu případu způsobenému homologní rekombinací, který by vedl k získání potomstva s fenotypem toxin+/tvorba infekčních OB+, se zabrání tím, že delece a inzerce genů se odehrává na stejném místě a nikoliv daleko od sebe na různých lokusech virového genomu. Proto se gen pro toxin nachází jenom ve virech, které jsou geneticky defektní pro produkci infekčních OB. Toto zamezení šíření heterologního genu pro toxin se zachová

a infekční virus zmizí z ekosystému rychleji než virus divokého typu, vzhledem k jeho snížené schopnosti vytvářet potomstvo.

Pro lepší pochopení tohoto vynálezu jsou dále uvedeny následující příklady. Tyto příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nikoliv proto, aby omezovaly rozsah tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

V příkladech se používají standardní techniky molekulární biologie podle postupů, které popsali Sambrook a další /Sambrook, J., a další, Molekulární klonování: laboratorní příručka (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)/. Dále se používají standardní techniky pro růst a produkci baculovirů podle postupů, které popsali Summers a Smith /Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures), Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)/. Všechny odkazy na "pojmenované" restriční fragmenty viru AcMNPV vycházejí z fyzických map E2 kmene viru AcMNPV, které publikovali Summers a Smith ve výše uvedené Příručce způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk.

P ř í k l a d 1

Konstrukce přenosového vektoru Δ p74-1 a rekombinantního viru A4000

Přenosový vektor Δ p74-1 se zkonstruuje za účelem deletování p74 genu z E2 kmene viru *Autographa californica* NPV, které se děje přibližně v místě jednotky 90 na mapě baculovirového genomu (viz obr. 1). Bst EII fragment "E", který obsahuje DNA kódující gen p74, se vyčistí z E2 kmene virové DNA. Tento fragment se klonuje na Bst EII místo pSE280 plazmidového vektoru (výrobce Invitrogen, San Diego, CA). Tento klon se nazývá LB10.2. Fragment kódující 5'oblast genu p74 a 5'lemující sekvence se izoluje z klonu LB10,2 štěpením enzymem Nco I. Dále se na tomto Nco I místě připraví tupý konec T4 DNA polymerasou, ten se štěpí enzymem Xho I a výsledný fragment se čistí v gelu. Tento fragment, v němž místo Nco I opatřené tupým koncem bylo štěpeno Xho I enzymem, se klonuje mezi Kpn I místo opatřené tupým koncem a Xho I místo plazmidu LB9.6. Plazmid LB9.6 je derivátem "Bluescript SK" plazmidu (výrobce Stratagene, La Jolla, CA), do kterého se na Hinc II místo vloží polylinker. Tento linker obsahuje další místa pro jednotlivé restriční enzymy, která jsou užitečná pro inzerci heterologních genů do deletované oblasti genu p74 (viz dále v textu). Výsledný plazmid obsahující 5'lemující sekvence a 5'sekvence genu p74, popsané výše v textu, se nazývá LB 11.12. Dále se izoluje fragment genu p74 kódující 3'třetinu tohoto genu a 3'lemující sekvence, který je ohraničený na jedné straně Hpa I místem a na druhé Bam HI místem. Tento fragment se klonuje mezi Eco RV místo a Bam HI místo plazmidu LB 11.12. Výsledný klon je přenosovým vektorem Δ p74-1 (viz obr. 2). Tento přenosový vektor kóduje 4750 párů bází (bp) 5'lemujících sekvencí, sekvence genu p74 od bp 1 do bp 69, 64 bp plazmidového polylinkeru, popsaného výše v textu,

sekvence genu p74 od bp 1287 k terminačnímu kodónu na místě 1937 a 1796 bp 3'lemujících sekvencí /Kuzio, J., a další, Virology, 173, 759-763 (1989)/. Obr. 3 ukazuje deleci v p74 kódující oblasti podrobněji. Tento přenosový vektor se dále použije pro konstrukci A4000 kmene uvedeného viru standardními postupy kotransfekce /Webb, N. R., a Summers, M. D., J. Methods Cell & Molec. Biol., 2, 173-188 (1990)/. Množství 2×10^6 Sf9 buněk se zaočkuje na misku pro tkáňové kultury o průměru 60 mm. Při přilnutí buněk se očkovací médium odstraní z buněk a nahradí se 0,75 ml média podle Grace, které obsahuje 10 % fetálního telecího séra (FCS) s antibiotiky. Do 0,75 ml transfekčního pufru (složení: 25 mM HEPES, pH 7,1, 140 mM roztok NaCl, 125 mM roztok CaCl_2) se přidá 1 μg DNA z viru AcMNPV a 2 μg DNA z vektoru Δ p74-1. Tento pufr obsahující DNA se po kapkách přidá k buňkám a buňky se 4 hodiny inkubují při teplotě 27 °C. Po 4 hodinách se médium odstraní a buňky se opatrně promyjí čerstvým roztokem TNMFH, obsahujícím 10 % FCS a antibiotika. Po 4 až 5 dnech se sklídí ECV viry a jednotlivé plaký se izolují pomocí stanovení plaků, které popsali Summers a Smith /Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures), Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)/.

Jednotlivé plaký se potom použijí pro infikování jednotlivých jamek na plotně pro tkáňové kultury obsahující 48 jamek, přičemž do každé jamky se předem zaočkuje množství $7,5 \times 10^4$ Sf9 buněk v 0,5 ml čerstvého TNMFH média. Po 5 dnech se z každé jamky buď v řadě nebo sloupci odebere do zásoby 10 μl supernatantu obsahujícího pučící virus. Zahájí se PCR reakce, přičemž se použijí 4 μl zásobního super-

natantu a oligomery A a C ukázané na obr. 3. Protože oligomer C je specifický pro deletovaný gen p74, amplifikuje se fragment jenom v těch reakčních směsích, které obsahují rekombinantní virus. PCR reakce se spustí následujícím způsobem: 4 μ l zásobního supernatantu se nejprve štěpí hodinu při teplotě 55 °C nespecifickou proteasou (o koncentraci 200 μ g/ml) ze *Streptomyces griseus* (výrobce Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) v 25 μ l reakční směsi obsahující 1X pufr A /o složení: 10 mM Tris (pH 0,3), 50 mM roztok KCl, želatinu o koncentraci 0,1 μ g/ml, 0,45 % Nonidet P40 (výrobce Shell Oil Co.) a 0,45 % Tween 20 (výrobce ICI Americas, Inc.)/. Nespecifická proteasa se potom inaktivuje zahříváním po dobu 12 minut při teplotě 95 °C. PCR amplifikace spočívá ve smíchání viru ošetřeného proteasou, s množstvím 50 pmol každého ze specifických oligonukleotidových primerů v 50 μ l reakční směsi, která obsahuje 200 μ M čtyř dNTP (dATP, dGTP, dCTP a dTTP), 1,5 mM $MgCl_2$, 1X pufr A a AmpliTaq DNA polymerasu o koncentraci 1,25 jednotky (výrobce Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). Vzorek se podrobí 30 amplifikačním cyklům, z nichž každý se skládá ze tří kroků: 1 minuta při teplotě 94 °C (denaturační krok), 1,5 minuty při teplotě 55 °C (ochlazovací krok) a 2,5 minuty při teplotě 72 °C (prodlužovací krok). Po 25 cyklech následuje prodlužovací krok o délce 7 minut při teplotě 72 °C. 20 μ l reakční směsi se podrobí elektroforéze v agarosovém gelu o koncentraci 1,2 %, aby se potvrdila přítomnost rekombinantního viru. Protože vzorky jsou organizovány podle řad a sloupců, rekombinantní virus se identifikuje podle jamky, která je společná pozitivní řadě i pozitivnímu sloupci.

P ř í k l a d 2 .

Demonstrace fenotypu viru A4000 při zkoušce na terčících listů s druhem *Heliothis virescens*

Standardní zkouška na terčících listů se provádí na larvách a *Heliothis virescens* ve stadiu třetího instaru, aby se testovala infekčnost virového kmene A4000. K lístku bavlníku tvaru terčíku o průměru 5 mm, který je umístěn v jamce obsahující předem navlhčený terčík z filtračního papíru (terčík má asi 4 mm v průměru a je navlhčen 30 μ l vody), se přidá kapička o objemu 1 μ l obsahující virus (s definovanou dávkou PIB) v TET pufru /složení: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5/10 mM EDTA/0,1 % Triton X-100 (výrobce Rohm and Haas, Philadelphia, PA). Po vyschnutí kapky se do jamky umístí jedna larva a jamka se uzavře. Larvy se nechají přes noc žít. Další den ráno se larvy, které zkonsumovaly celý listový terčík, přenesou do jednotlivých jamek obsahujících stravu pro hmyz. Úmrtnost larev se sleduje dokud se larvy, které přežily, nezakuklí. Tento postup se opakuje s virovým kmenem AcMNPV divokého typu E2 označeným A1000, který se použije jako kontrola. Dále jsou uvedeny výsledky dvou oddělených testů:

Virus	Dávka (PIB)	Počet uhynulých larev
<u>Test 1</u>		
A4000	$2,5 \times 10^5$	1/31
(Δ p74)	5×10^4	0/32
	5×10^3	0/31
	5×10^2	0/32
A1000	5×10^2	16/18
(divoký typ)	5×10^1	14/31

Test 2

A4000	5	$\times 10^6$	0/20
(Δ p74)	5	$\times 10^5$	0/21
	5	$\times 10^4$	0/24
	5	$\times 10^3$	0/20
A1000	5	$\times 10^2$	22/32
(divoký typ)	5	$\times 10^1$	5/32

Tyto výsledky ukazují, že virus obsahující delecii v p74 genu není infekční ani v dávkách 10 000 krát vyšších než infekční virus obsahující intaktní p74 gen. Nepředpokládá se, že úhyn jedné larvy při použití kmene A4000 byl způsoben normálním infikováním.

P ř í k l a d 3

Příprava neinfekční formy viru komplementací kmene A4000 při růstu v buněčné linii, obsahující nestabilně integrovanou kopii Hind III fragmentu "P" viru AcMNPV

Sf9 buňky se kotransfekují podle postupů popsaných v příkladu 1. Při transfekcích se použije 1 μ g genomové virové DNA viru A4000 a desetinásobný molární přebytek plazmidové DNA z plazmidu ACOO28.3. Plazmid ACOO28.3 se skládá z Hind III fragmentu "P" viru AcMNPV, vloženého na Hind III místo plazmidu Bluescript KS II (výrobce Stratagene, La Jolla, CA). Hind III fragment "P" je vyznačen v horní části obr. 2 jako část Bst EII fragmentu "E" viru AcMNPV. Tento fragment obsahuje kódující sekvenci celého genu p74 s množstvím 221 bp 5'lemujících sekvencí a 56 bp 3'lemujících sekvencí. Po 48 hodinách se polyedry získají z infikovaných buněk odstředováním při nízké rychlosti a

následným resuspendováním v TET pufriu. K resuspendovanému viru se přidá roztok SDS tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 %. Buněčná DNA se naruší střížnými silami při intenzivním míchání a pipetování vzorku. Pro odstranění buněčné DNA se provádí řada následných promývání PIB částic v TET pufriu bez SDS, po nichž následuje odstředování při nízké rychlosti. Nakonec se PIB částice resuspendují v TET pufriu a za účelem stanovení se spočítají na hemocytometru. Biostanovení se provede podle postupu popsaného v příkladu 2. Při dávce 1×10^5 PIB nezpůsobí samotné polyedry z Sf9 buněk transfektovaných DNA z viru A4000 úhyn larev. Částice PIB z Sf9 buněk kotransfekovaných DNA z viru A4000 a DNA z plazmidu ACOO28.3 způsobí úhyn larev, vzhledem k tomu, že jsou infekční. Růst viru A4000 v buňkách poskytujících funkční p74 protein (vzhledem k přítomnosti ACOO28.3 plazmidu) tedy způsobí tvorbu A4000 viru, který je infekční pro hmyz. Tento virus je schopný způsobit produktivní infekci v larvách. Tento výsledek se potvrdí sklizením částic PIB z mrtvých larev. Částice PIB se získají umístěním mrtvých larev do pohárku s odstraněným dnem, které je nahrazeno Nytexem (výrobní značka firmy Tetko, Briarcliff Manor, N.Y.). Mrtvé larvy se potom přelijí TET pufrem (množství 1 ml/larva) a shromáždí se ty části výtoku, které obsahují PIB částice. Tyto PIB částice se resuspendují v TET pufriu obsahujícím 1% roztok SDS. Suspenze se promíchá a odstředí při nízké rychlosti. PIB částice se dále několikrát promyjí TET pufrem bez SDS. DNA z těchto PIB se získá postupem, popsaným v příkladu 6, podle Summerse a Smithe /Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures), Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)/. Přítomnost Δ p74 viru v

těchto mrtvých larvách se potvrdí PCR amplifikací, při níž se použijí oligomery popsané v příkladu 1.

P ř í k l a d 4

Konstrukce expresních vektorů obsahujících heterologní promotor

Použití heterologních promotorů pro řízení exprese p74 genu může zvýšit účinnost komplementace p74 viru. Expresní vektory vhodné pro toto použití se skládají z následujících modulů: (1) heterologní promotorový modul, který se používá pro regulaci transkripce; (2) polylinkerový modul, který usnadňuje inzerci DNA sekvencí, jejichž exprese se požaduje, a (3) modul, obsahující 3'UTR oblast, která poskytuje místo zpracování primárního transkriptu a polyadenylaci (viz obr. 4). Takový expresní vektor, který obsahuje DA26 genový promotor viru AcMNPV, polylinker a 3'UTR oblast pro základní protein 6,9 K z viru AcMNPV, se nazývá pMEV1. Vzorky *E. coli* kmene DH5 nesoucího specifický pMEV1 izolát, označené AC0064.1, byly uloženy 7. dubna 1993 v Americké sbírce typů kultur a bylo jim přiděleno ATCC přírůstkové číslo 69 275.

Další vektory se mohou snadno připravit náhradou promotoru, obsahujícího Pst I/Xba I fragment pMEV1, fragmenty štěpenými Pst I/Xba I, které obsahují oblast kódující 6,9 K oblast virového promotoru viru AcMNPV (vektor pMEV2). Místo oblasti kódující 6,9 K oblast promotoru viru AcMNPV může být ve fragmentech, štěpených Pst I/Xba I, promotorová oblast kódující polyhedrin (vektor pMEV3) nebo 35 K oblast virového promotoru (vektor pMEV4).

Promotorové fragmenty použité při konstrukci těchto

vektorů se vytvoří PCR amplifikací klonované virové DNA s použitím promotor-specifických párů oligonukleotidových primerů. Primery se vytvoří tak, že amplifikované promotorové segmenty mají následující obecnou strukturu obsahující: (1) heteropolymerní syntetickou sekvenci utvořenou z 22 5'koncových párů bází s rekogničními místy pro restriční endonukleasy Sst I, Sse 8387I a Stu I (v tomto pořadí); (2) segment virové DNA, který začíná od pozice umístěné 100-350 bp proti směru transkripce od hlavního startovacího místa transkripce daného genu a pokračuje k 3'konci 5'UTR oblasti (tj. k pozici -1, označené s ohledem na translační iniciační kodón), a (3) heteropolymerní oblast utvořenou z 23 3'koncových bp s rekogničními místy pro restriční endonukleasy Esp 3I a Xba I (v tomto pořadí). Poloha a orientace Esp I a rekogničního místa lokalizuje místa štěpení mezi pozice -5 a -4 v (+)vláknu a mezi pozice -1 a +1 v (-)vláknu.

Templátem použitým pro přípravu 35 K promotorů je Hind III fragment "K" viru AcMNPV. Sekvence primeru (+)vlákna obsahuje heteropolymerní sekvenci o velikosti 22 bp s místy pro restriční enzymy Sst I, Sse 8387I a Stu I a 35 K sekvenci 5'konce sahající od pozice -399 do pozice -382. Primer (-)vlákna obsahuje 35 K sekvenci 5'konce od -21 do -1, následovanou heteropolymerní oblastí o velikosti 23 bp s místy pro restriční enzymy Esp 3I a Xba I. Pro každou amplifikační reakci se 50 pmol vhodného páru primerů smíchá s 250 pg templátu DNA v 50 μ l reakční směsi obsahující 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M bází dNTP, 100 μ g/ml želatiny a 2,5 jednotky AmpliTaq DNA polymerasy (výrobce Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). Vzorek se amplifikuje při 25 cyklech skládajících se ze 3 kroků: 1 min při teplotě 94 °C (denaturační krok), 1,5 min při teplotě 55 °C (ochlazovací krok) a 3 min při teplotě 72 °C (prodlužovací krok). Jako při jiných reakcích k době

posledního reakčního kroku se přidá 7 minut.

Každá reakce se ukončí přidavkem EDTA na koncentraci 10 mM v reakční směsi a Sarkosylu (N-lauroylsarkosin sodný) na koncentraci 2 g/l. Produkty se potom extrahují jednou chloroformem a jednou směsí fenol:chloroform a vysrážejí se ethanolem. Vzorky DNA se znovu rozpustí ve vhodném pufru a potom se štěpí Pst I (tento enzym rozpoznává šest centrálních párů bází [CTGCA G] místa pro Sse 8387I) a Xba I. Každý předpokládaný promotorový fragment se dále čistí gelovou elektroforézou v 1,2 % agarosovém gelu s nízkou teplotou tání a liguje se do Pst I/Xba I vektorového fragmentu o velikosti 3,2 kb, připraveného z pMEV1. Tento fragment obsahuje polylinkerový modul, 3'UTR modul a SK+ základ plazmidu Bluescript z pMEV1. Žádané rekombinanty se identifikují analýzou restrikčními enzymy a určením sekvence DNA. Odborníci v oboru mohou podle tohoto postupu připravit jakoukoliv promotorovou oblast, jejíž sekvence je dostupná, jako je například 6,9 K promotor viru AcMNPV, polyhedrinový promotor nebo buněčné promotory, například hsp 70 promotor z *Drosophila melanogaster*.

P ř í k l a d 5

Příprava heterologních konstruktů obsahujících promotor-p74 kódující oblast

Protein kódující oblast genu p74 se izoluje PCR amplifikací vhodné oblasti ACO028.3, aby se mohla vložit do expresních vektorů obsahujících heterologní promotory (jak je popsáno v příkladu 4). V PCR reakci se použije primer (+)vlákna o velikosti 24 bp, jehož 5'konec je na ATG translačním startovacím místě p74 genu. Primer (-)vlákna o velikosti 29 bp se skládá z 20 bp 3'sekvence genu p74 končící

TAA translačním stop kodónem, za níž je umístěna další sekvence o velikosti 9 bp obsahující Bam HI místo. Při PCR reakci se 250 pmol ACOO28.3 smíchá s 50 pmol každého ze specifikovaných oligonukleotidových primerů v 50 µl reakční směsi, obsahující 200 µM každého dNTP (dATP, dGTP, dCTP a dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 1 X pufr A a 1,25 jednotky AmpliTaq DNA polymerasy (výrobce Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). Vzorek se podrobí 5 cyklům amplifikace, přičemž každý cyklus se skládá z 1 min při teplotě 94 °C (denaturační krok), 1,5 min při 45 °C (ochlazovací krok) a 3 min při 72 °C (prodlužovací krok). Dále následuje 25 amplifikačních cyklů, které se skládají z 1 min při 94 °C (denaturační krok), 1,5 min při 55 °C (ochlazovací krok) a 2,5 min při 72 °C (prodlužovací krok). PCR reakce se ukončí prodlevou 7 min při 72 °C.

Po čištění se reakční produkty ošetří Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I /Sambrook, J., a další, Molekulární klonování: laboratorní příručka (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)/ v přítomnosti všech čtyř dNTP, aby se zajistilo, že PCR produkty budou mít tupé konce. 3'konec p74 kódující oblasti se potom štěpí Bam HI a výsledný fragment se čistí elektroforézou v 1 % agarosovém gelu s nízkou teplotou tání. Tento fragment se potom klonuje do jakéhokoliv vektoru z několika expresních vektorů popsanych v příkladu 4. Při tvorbě expresních vektorů pro inzerci p74 genu se každý vektor štěpí Esp 3I a výsledné přečnávající 5'konce se doplní působením DNA polymerasy I z E. coli (Klenowův fragment) v přítomnosti všech čtyř dNTP. Každý vektor se potom štěpí Bam HI. Vektor se oddělí od uvolněného polylinkerového fragmentu elektroforézou v 1% agarosovém gelu s nízkou teplotou tání. Potom se při oddělených reakcích tento vektor liguje s fragmentem obsahujícím p74 gen.

P ř í k l a d 6

Izolace stabilních Sf9 buněčných linií obsahujících funkční kopii p74 genu integrovanou do buněčného genomu

V tomto příkladu se izolují deriváty Sf9 buněk, které obsahují konstrukty s genem p74, přičemž tyto konstrukty jsou integrovány do buněčného genomu. Postup izolace popsali Jarvis a další /Jarvis, D. L., a další, Biotechnology, 8, 950-955 (1990)/. V tomto příkladu se používá plazmid označený ACO028.3 (ATCC 68.987). Tento plazmid obsahuje Hind III fragment "P" viru AcMNPV, který zahrnuje p74 gen a malé množství původních lemujících sekvencí. Nejprve se Sf9 buňky kotransfekují směsí 2 µg DNA ACO028.3 plazmidu a 1 µg DNA plazmidu IE-1 Neo /Jarvis, D. L., a další, Biotechnology, 8, 950-955 (1990)/. Po transfekci se buňky 2 hodiny inkubují při teplotě 28 °C. Po promytí buněk kompletním TNMFH médiem /Sambrook, J., a další, Molekulární klonování: laboratorní příručka (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)/ se buňky opět dají do živného média a inkubují se 22 hodin při teplotě 28 °C. Buňky se potom naočkují v nízké koncentraci na misky tak, aby vzniklá kultura byla řídká a dodá se kompletní TNMFH médium s 0,5 mg/ml analogu neomycinu G418 (výrobce GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.) (uvedená koncentrace analogu G418 je uvedena pro aktivní bázi této látky). Buňky se potom inkubují týden při teplotě 28 °C. Na konci týdne se médium vymění a použije se kompletní TNMFH médium bez G418. Následující postup se použije pro každou ze tří oddělených misek. Přežívající buňky se sklídí a pomnoží. Tři pomnožené sady buněk jsou stabilními buněčnými liniemi, označenými Sf9(28,3)CL-1, Sf9(28.3)CL-2 (ATCC CRL 11,322) a Sf9(28.3)CL-3. Tyto smíšené populace se napěstují a potom se kontrolují na přítomnost p74 genu za použití PCR reakce, jak

je popsáno v příkladu 1. Při této PCR reakci se použije oligomer specifický pro (+)vlákno genu p74 (oligomer A) a oligomer specifický pro oblast chybějící v p74 genu viru A4000 (oligomer B). Oligomery jsou znázorněny na obr. 3.

P ř í k l a d 7

Produkce A4000 viru infekčního pro hmyz pěstováním ve shora uvedených buněčných liniích a demonstrace jeho fenotypu

Každá z uvedených tří buněčných linií, izolovaných způsobem popsaným v příkladu 6, se infikuje při hodnotě MOI větší než 1 virem A4000. Produkce viru nastává při hodnotách MOI v rozmezí asi od 0,01 do 20. Částice PIB se získají z infikovaných buněk způsobem popsaným v příkladu 3. Provede se standardní zkouška na terčících listů (viz příklad 2). Dále jsou uvedeny výsledky tří oddělených testů. Virus A1000 je E2 kmen divokého typu viru AcMNPV:

Virus/Buněčná linie (Pasáž číslo)	Dávka (PIB)	Počet uhynulých/ Počet testovaných	% úmrtnosti
<u>Test 1</u>			
A4000/Sf9	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-1(P3)	1×10^5	7/16	44
A4000/CL-2(P2)	1×10^5	9/15	60
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	6/16	38
A1000/Sf9	1×10^3	30/32	94
kontrola	0	0/30	0

Test 2

A4000/Sf9	1×10^5	0/15	0
A4000/CL-1(P3)	1×10^5	1/15	6
A4000/CL-2(P2)	1×10^5	4/16	25
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	6/16	38
A1000/Sf9	1×10^3	21/28	75
kontrola	0	0/32	0

Test 3

A4000/Sf9	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-1(P7)	1×10^5	5/16	31
A4000/CL-2(P6)	1×10^5	5/16	31
A4000/CL-3(P6)	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	3/15	20
A1000/Sf9	1×10^3	17/31	55
kontrola	0	0/15	0

Z těchto údajů je zřejmé, že když se Sf9 buňky stabilně transformované plazmidem ACOO28.3 infikují virem A4000, tak výsledné PIB částice jsou orálně infekční. Naopak PIB částice z rodičovských netransformovaných Sf9 buněk infikovaných virem A4000 nezpůsobují úhyn larev. To znamená, že pěstování viru A4000 v buňkách poskytujících funkční p74 protein (což je způsobeno stabilní integrací konstruktů p74 genem, jak je popsáno v příkladu 6) má za následek produkci viru A4000, který je infekční pro hmyz. Příčina neproběhnutí komplementace v pasáži číslo 6 buněčné linie Sf9(28.3)CL-3 není známa.

DNA se dále připraví (jak je popsáno v příkladech 3 a 6 podle Summerse a Smithe /Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures), Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M

University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)) z částic PIB jednotlivě sklizených z dvaceti larev, které byly usmrčeny komplementovaným virem při testu 1 výše v textu. Pro zkoušení přítomnosti Δ p74 viru, se provede PCR amplifikace s použitím primerů A a C a pro zkoušení přítomnosti divokého typu viru s použitím primerů A a B (všechny primery viz obr. 3). Postup při PCR amplifikaci je popsán v příkladu 1. Výsledky ukazují, že všech dvacet larev bylo infikováno Δ p74 virem. Kromě pozitivního signálu pro Δ p74 virus vykazuje pět z dvaceti larev silný PCR pás specifický pro přítomnost intaktního p74 genu. S PIB částicemi izolovanými z 18 z dvaceti larev z testu 1 se provede zkouška na terčících listů (viz příklad 2). Pro každý vzorek se použije dávka 1×10^5 PIB/larva a 32 testovacích larev. Úmrtnost nad úroveň kontroly vykazují jenom částice PIB, izolované ze čtyř zkoumaných larev s pozitivním signálem na přítomnost intaktního p74 genu. Částice PIB ze žádné ze 14 zkoumaných larev, u nichž byl pozitivní test jenom na přítomnost deletovaného p74 genu, nezpůsobily úmrtnost larev nad úroveň kontroly.

Tyto výsledky by měly být pravděpodobně způsobeny jednou ze dvou následujících příčin. Příčinou by mohl být fakt, že vzorky komplementovaného viru jsou kontaminované virem divokého typu a že některé larvy z původního testu (testu 1) nesou virus divokého typu. Když by se tyto larvy dále infikovaly Δ p74 virem, mohly by být v PIB přípravcích z těchto larev přítomné jak PIB částice viru divokého typu, tak PIB částice Δ p74 viru. Alternativním vysvětlením by mohlo být, že se během pěstování Δ p74 viru v komplementující buněčné linii vyskytne homologní rekombinace mezi tímto virem a p74 sekvencemi, integrovanými do buněčného genomu. Jestliže se rekombinace vyskytne v malé míře, potom jenom některé larvy, které zahynou působením

komplementovaného viru, by také obsahovaly virus divokého typu. Tento virus divokého typu by byl v druhém cyklu stanovení orálně infekční. V přítomných konstruktech existuje homologie o velikosti 284 bp mezi Δ p74 virem na 5'konci delece a sekvencemi genu p74, integrovanými do buněčného genu a homologie o velikosti 713 bp na 3'konci delece. Je-li toto alternativní vysvětlení správné, potom se tomuto výsledku může zabránit snížením velikosti, nebo je-li to nutné, vyloučením této homologní sekvence vyskytující se mezi virem a buněčnou linií.

P ř í k l a d 8

Konstrukce transgenních hmyzích druhů, které obsahují funkční kopii p74 genu stabilně integrovanou do hmyzího genomu

V tomto příkladu se pro konstrukci transgenních hmyzích kmenů použije balistické zavedení DNA pomocí wolframových částic /Baldarelli, R. M., a Lengyel, J. A., Nucleic Acids Res., 18, 5903-5904 (1991)/. Pro jeden z p74 konstruktů, popsaných v příkladu 5, se vysráží 20 až 100 μ g DNA v injekčním pufu pro embrya (0,1 M fosforečnan sodný, pH 6,8, 5 mM KCl) na povrchu promytých wolframových částic o poloměru 1,2 μ m (výrobce Bio-Rad, Richmond, CA). Celkový objem srážecí reakční směsi je 65 μ l. Po srážení se odstraní 50 μ l supernatantu. Těsně před vnesením 8 μ l do makroprojektilu se peleta a 12 až 15 μ l supernatantu intenzívně promíchá. Pro bombardování embryí *Trichoplusia* ni s odstraněnou vnější blánou, ve stadiu vývoje před vytvořením blastodermu, se použije balistický systém pro dopravu biočástic /A Biolistics bioparticle delivery system (výrobce DuPont, Wilmington, DE)/. Během tohoto postupu jsou embrya zachycena na filtračním papíru. Embrya se potom umístí pod

Series 700 halocarbon oil (výrobce Halocarbon Products Corp., Hackensack, N.J.), dokud se nevylíhnou. Po vylíhnutí přeživšího hmyzu se do schránek dohromady umístí vždy skupina 25 těchto hmyzích jedinců. Vajíčka z těchto schránek se shromáždí a z embryí se připraví DNA způsobem, který popsal Roberts /Roberts, D. B., ed., *Drosophila: praktický přístup* (Drosophila: A Practical Approach), str. 276, IRL Press, Oxford, England (1986)/. Aby se určila schránka, ve které vajíčka obsahují p74 gen, provede se PCR reakce (viz příklad 1) s použitím oligomerů A a B, zobrazených na obr. 3. Když se identifikují pozitivní hmyzí skupiny, vajíčka z těchto skupin se vyživují a nechají se vyvíjet až do dospělosti. Jednotlivé páry dospělých jedinců se spáří a DNA izolovaná z jejich vajíček se opět testuje PCR reakcí na přítomnost p74 genu. Tento proces pokračuje, dokud se nevytvoří linie můr, které jsou pro p74 gen homozygotní.

P ř í k l a d 9

Produkce A4000 viru infekčního pro hmyz pěstováním ve shora popsaných transgenních druzích hmyzu a demonstrace jeho fenotypu

Nejprve se malému počtu (10 až 20) transgenních larev druhu *Trichoplusia* ni ve čtvrtém instarstadiu podá injekčně do hemolymfy 5 μ l tkáňového kultivačního média s množstvím 1×10^5 částic napučeného viru A4000. Po 4 až 5 dnech, kdy se zaznamená úhyn většiny larev způsobený virem A4000, se sklídí PIB částice způsobem popsaným v příkladu 3. Tyto PIB částice se potom použijí pro další pomnožení. Transgenní larvy *Trichoplusia* ni ve třetím instarstadiu, které obsahují jeden z p74 konstruktů popsaných v příkladu 5, se na obdélnících o rozměrech 2,54 x 3,81 cm krmí stravou povrchově kontaminovanou 0,4 μ l média o koncentraci 1×10^6

PIB částic A4000 viru v 1 ml. Po 5 až 6 dnech, kdy se u většiny larev zaznamená smrt způsobená virem A4000, se PIB částice sklídí způsobem popsáným výše v textu. Vzorek těchto PIB částic se uchovává v TET pufru jako zásoba. Biologické účinky viru se dále stanoví standardní zkouškou na terčících listů s larvami *Trichoplusia ni* divokého typu ve druhém instarstadiu. Výsledky ukazují, že pěstování viru A4000 v transgenních druzích hmyzu, obsahujících funkční p74 gen, obnoví infekčnost viru vůči hmyzu na přibližně normální úroveň. Avšak virus sklizený z těchto larev divokého typu, které byly usmrceny tímto komplementovaným virem, má sníženou schopnost infikovat hmyz orálně.

P ř í k l a d 10

Inzerce genu kódujícího toxin do p74-1 transferového vektoru a izolace rekombinantního viru A4TxP-I

Fragment DNA, kódující toxin z roztoče *Pyemotes tritici* (TxP-I) specifický pro hmyz, se izoluje z cDNA klonu Tox34 /Tomalski, M. D., a Miller, L. K., *Nature*, 352, 82-85, (1991)/. Eco RI fragment, obsahující celou protein-kódující oblast genu s nějakými nepřeloženými oblastmi na 5'a 3'konci, se klonuje do AcMNPV pVL 1393 vektoru (souprava Invitrogen, San Diego, CA). Fragment s tupými konci, sahající od Eco RV místa k Hind III místu, vytvořený z tohoto konstruktů se vloží do transferového vektoru Δ p74-1 na Afl II místo, které je uvnitř dané delece (viz obr. 2). Výsledkem společné transfekce tohoto plazmidu označeného LB15.9, s genomovou DNA viru A4000 do Sf9 buněk, je rekombinantní virus, který kóduje TxP-I gen a který nemůže orálně infikovat larvy. Injekční vpravení napučené formy tohoto viru do hemolymfy larev *Heliothis virescens* ve čtvrtém instarstadiu však způsobí charakteristickou

paralýzu, vzniklou expresí genu TxP-I. Kromě toho se pěstováním tohoto viru způsoby popsanými v příkladech 3, 7, a 9 docílí produkce A4TxP-I viru infekčního pro hmyz. Tento infekční A4TxP-I virus může orálně infikovat larvy a vyvolat paralýzu. Avšak virus vytvořený těmito infikovanými larvami si nezachová svoji infekčnost pro hmyz.

P ř í k l a d 11

Konstrukce expresního vektoru obsahujícího kodonově optimalizovaný AaIT gen

Toxin AaIT specifický pro hmyz se nachází v jedu severoafrického škorpióna *Androctonus australis* Hector. Zkonstruuje se transferový vektor pro inzerci AaIT genu do genové oblasti viru AcMNPV kódující polyhedrin. Tento vektor označený AC0055.1 obsahuje AaIT gen vložený na BamHI místo plazmidu pVL 985 /Roberts, D. B., ed., *Drosophila: praktický přístup* (*Drosophila: A Practical Approach*), str. 276, IRL Press, Oxford, England (1986)/ a sestává z kodonově optimalizované nukleotidové sekvence pro zralý AaIT toxin, spojené se sekvencí pro signální peptid kutikulového genu z *Drosophila melanogaster*. Vzorky *E. coli* kmene HB101 nesoucího tento transferový vektor AC0055,1 byly uloženy 17. prosince 1992 v Americké sbírce typů kultur a dostaly ATCC přírůstkové číslo 69 166.

Pro následné vložení do expresních vektorů podle příkladu 4 se toxin-kódující segment tohoto transferového vektoru získá PCR reakcí. Primerem (+)vlákna použitým v této reakci je oligonukleotid o velikosti 27 bází, jehož 5'konec se shoduje s ATG iniciačním kodónem pro translaci AaIT genu, který je kodonově optimalizovaný a který se má amplifikovat (AaIT gen je obsažen v AC0055.1 vektoru).

Primer (-)vlákna hybridizuje s místem, které leží ve vektoru AC0055.1 vzdáleno asi 35 až 40 bp od 3'konce AaIT genu po směru přepisu. Podmínky pro PCR reakci jsou v zásadě popsány v příkladu 1. Po purifikaci se reakční produkty čistí způsobem popsaným v příkladu 5, s výjimkou toho, že fragment se čistí elektroforézou v 1,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tání.

Pro přípravu expresních vektorů pro inzerci toxinového genu se každý vektor štěpí enzymem Esp 3I a vzniklé 5'přečnávající konce se doplní působením DNA polymerasy I (Klenowova fragmentu) z E Coli za přítomnosti všech čtyř dNTP bází. Každý preparát se dále štěpí BamHI. Vektor se oddělí od uvolněného polylinkerového fragmentu elektroforézou v 1% agarosovém gelu s nízkou teplotou tání a potom se liguje v oddělených reakcích s genovým fragmentem kódujícím AaIT toxin.

P ř í k l a d 12

Izolace rekombinantního A4001 viru kódujícího AaIT toxin

Aby se připravila DNA viru A4000 pro inzerci genu, linearizuje se tato DNA postupným štěpením enzymy Sse 8387I a Bsu 36I. V typickém uspořádání se 40 µg DNA viru A4000 štěpí 2 hodiny při teplotě 37 °C enzymem Sse 837I v množství 100 jednotek (výrobce Takara Biochemical, Inc., Berkeley, CA) ve 250 µl reakční směsi, obsahující 10 mM pufr Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiotreitolu (DTT), 50 mM NaCl a 0,01 % BSA. Reakční směs se potom upraví 100 mM NaCl a 50 mM pufru Tris-HCl, pH 7,9 a DNA se štěpí 2 hodiny při teplotě 37 °C enzymem Bsu 36I v množství 100 jednotek (výrobce New England Biolabs, Beverly, MA). Potom se reakce ukončí

přidáním SDS na výslednou koncentraci 10 g/l, NaCl na výslednou koncentraci 0,3 M a EDTA na koncentraci 10 mM. Dále se DNA chromatograficky čistí v "poly-prep" koloně (výrobce BioRad Laboratories, Richmond, CA), obsahující 2 ml Sephacryl-300 (výrobce Pharmacia, Piscataway, N.J.), uvedené do rovnováhy 10 mM pufrém Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM roztokem EDTA, 0,1% roztokem SDS a 0,3 M roztokem NaCl. Zachytí se 12 frakcí o objemu 150 μ l. 10 μ l každé frakce se analyzuje gelovou elektroforézou, aby se identifikovaly frakce obsahující virovou DNA. Tyto frakce se spojí, extrahují se jednou směsí fenol:chloroform a virová DNA se potom vysráží ethanolem. DNA se resuspenduje v TE pufru (složení 10 mM Tris-HCl o pH 8,0, 1 mM EDTA) tak, aby koncentrace DNA byla 0,2 až 1 mg/ml a suspenze se skladuje při teplotě 4 °C. Pro stanovení, zda byla virová DNA kompletně linearizována, se alikvótní část DNA štěpí Eco RI a analyzuje se gelovou elektroforézou. Virová DNA vykazující Eco RI fragment o velikosti 7 kb nebyla štěpena Bsu 36I a Sse 8387I úplně a nepoužije se.

Expresní vektor obsahující AaIT gen, popsáný v příkladu 11, se štěpí Bsu 36I a Sse 8387I. 12 ng fragmentu kódujícího toxin se liguje s množstvím 0,5 μ g Bsu 36I/Sse 8783I-linearizované a vyčištěné DNA viru AcMNPV A4000 v 5 μ l reakční směsi, obsahující 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50 g/l polyethylenglykolu-8000 a 0,5 jednotky T4 DNA ligasy (výrobce Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Po inkubaci probíhající přes noc při teplotě 16 °C se celá ligační směs použije pro transfekci Sf9 buněk, jak je popsáno v příkladu 1.

Pět dnů po transfekci se z transfekovaných Sf9 buněk odstraní médium. Připraví se desetinasobná sériová zředění transfekčního supernatantu. Dva alikvótní podíly o objemu 1 ml ze zředění 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} se použijí pro

infekci buněk (množství $1,5 \times 10^6$) v kultivační misce o průměru 6 cm. Za hodinu po přidání viru se virové inokulum odstraní a buňky se přelijí médiem obsahujícím agarosu, jak je popsáno v předchozím příkladě. Když se plaky plně vyvinou, použijí se pro inokulaci jednotlivých jamek plotny se 48 jamkami. Výsledná další generace viru se analyzuje PCR reakcí s použitím primeru A (na obr. 3) jako primeru (+)vlákna a kutikulového-AaIT primeru (-)vlákna, popsaného v příkladu 11.

Po jednom nebo dvou dalších kolech purifikace plaků se připraví P1 zásoby /Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures), Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)/. Rekombinantní virus obsahující AaIT se označí A4001. Biologická aktivita tohoto viru se testuje injekční zkouškou na stanovení ECV. ECV forma viru se injekčně vpraví do larev *Heliothis virescens*, které jsou uprostřed čtvrtého instarstadia. Virus se titruje plakovou zkouškou (viz Summers, M. D., a Smith, G. E., Příručka způsobů přípravy baculovirových vektorů a kultivace hmyzích buněk) a potom se zředí na 2×10^7 , 2×10^6 a 2×10^5 PFU (plak tvořících jednotek) na ml v TNM-FH médiu obohaceném 0,5 % (obj.) červeně číslo 5. Každá larva se znecitliví působením oxidu uhličitého po dobu 2 až 5 minut a potom se do ní injekcí vpraví 0,5 μ l zředěného viru, přičemž se použije Hamiltonova injekční stříkačka vybavená cejchovanou jehlou č. 26. Jehla se vpíchne podélně mezi poslední dvě panožky a potom se posune ventrálně o dva až tři tělové články před vpich. Po injekci se každá larva prohlédne, zda neuniká obarvená hemolymfa. Je-li podezření na ztrátu vzorku nebo je-li jeho

ztráta zřejmá, larva se odstraní. Larvy se potom umístí do zakrytých stravovacích buněk o ploše 4 cm² (1 larva na buňku) a nechají se při teplotě 27 °C. Jednou denně se larvy vizuálně kontrolují, aby se zjistila jejich morbidita nebo mortalita. Larva se považuje za hynoucí (pozitivní odpověď), jestliže není schopna se vrátit po obrácení na hřbet během doby 0,5 až 2 minuty do správné polohy.

Když se do larev *H. virescens* injekčně vpraví množství 6×10^3 - 1×10^4 PFU viru, larvy odpovídající na infekci virem A4001 vykazují kontraktilní paralýzu a doba potřebná pro odpověď se sníží, srovná-li se charakteristická doba pro odpověď po infikování virem AcMNPV divokého typu s rekombinantním virem tvořícím AaIT toxin. Konkrétně průměrná doba odpovědi na rekombinantní virus (RT₅₀) je 50 % (s odchylkou 4 %) této hodnoty pro virus divokého typu v jedné zkoušce biologické aktivity. V druhé zkoušce je RT₅₀ rekombinantního viru 52 % (s odchylkou 5 %) této hodnoty pro virus divokého typu. Tento výsledek ukazuje, že inserce AaIT genu a kutikulové signální sekvence do viru AcMNPV (A4001) urychluje rychlost usmrcení pomocí exprese biologicky aktivního toxinu.

Při standardní zkoušce na terčících listů, popsané v příkladu 2, vykazují kontraktilní paralýzu charakteristickou pro AaIT toxin jenom larvy krmené A4001 virem, pěstovaným v záchranné buněčné linii Sf9(28.3)CL-2. Naopak larvy krmené A4001 virem, pěstovaným v Sf9 buňkách divokého typu, nevykazují kontraktilní paralýzu.

P ř í k l a d 13

Konstrukce transferového vektoru UAS_{GAL}-p74 a viru A4UAS

V tomto příkladu se na pozici -1 bp (proti směru přepisu) do p74 kódující oblasti viru vloží specifická kvasinková aktivační DNA sekvence UAS_{GAL} , která leží před regulovaným genem, dohromady s hsp 70 promotorem z *Drosophila melanogaster* o minimální velikosti -43 až -1 bp. GAL4 strukturní gen se izoluje z pLA plazmidu /Johnston, S. A., a další, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 6553-6557 (1986)/ v podobě fragmentu, ohraničeného BamHI a Hind III místem, o velikosti 2,9 kb. Tento GAL4 fragment se vloží do jednoho z vektorů obsahujících heterologní promotor tak, jak je popsáno v příkladu 5. Stabilní Sf9 buňky, které obsahují funkční kopie heterologních promotor-GAL4 konstruktů se izolují způsobem popsáným v příkladu 6. Pro vytvoření UAS_{GAL} -p74 rekombinantního viru se zkonstruuje UAS_{GAL} -p74 transferový vektor. Jako substrát pro PCR reakci, při níž vznikne fragment o velikosti 175 bp, se použije 17-hsp 70/lacZ konstrukt /Fischer, J. A., a další, Nature, 332, 853-856 (1988)/. Vytvořený fragment se skládá ze čtyř kopií repetice o velikosti 29 bp a obsahuje 17mer GAL4 rekogniční místo s vysokou afinitou fúzané s hsp 70 promotorem z *Drosophila melanogaster* o minimální velikosti -43 až -1 bp. Po přidání restrikčního místa Sma I na 5'konec a restrikčních míst Esp 3I a Nde I na 3'konec tohoto fragmentu se použijí specifické primery. Uvedená restrikční místa jsou zapotřebí pro následné klonovací kroky. Tento fragment se vloží do Δ p74-1 transferového vektoru (viz obr. 4) mezi 5'konec, na kterém je většinou Hind III místo tupě ukončené a Nde I místo p74 genu. Tento plazmidový klon se označí LB 17.8. Fragment s p74 kódující oblastí se vytvoří PCR amplifikační reakcí, při níž se použije p74-specifický primer pro (+)vlákno, popsáný v příkladu 5, a Bluescript, specifický primer T3 (výrobce Stratagene, La Jolla, CA) pro (-)vlákno. Na tento p74 fragment se působí Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I tak, jak již bylo dříve v textu popsáno. Po čištění se fragment štěpí enzymem Bcl I, který

působí v blízkosti 3'konce p74 genu. Plazmid LB 17.8 se připraví podobně štěpením enzymem Esp 3I a následným vytvořením tupých konců působením Klenowova fragmentu. Po čištění se tento vektor také štěpí Bcl I. Připravený vektor a p74 genový fragment se potom za standardních podmínek ligují dohromady. Tento klon, označený pUAS_{GAL}-p74, obsahuje kompletní p74 gen řízený hsp promotorem, přičemž tento promotor závisí na přítomnosti GAL4 proteinu. Rekombinantní AcMNPV virus nazvaný A4UAS se vytvoří způsobem popsáným v příkladu 1. Komplementovaný virus se připraví pěstováním tohoto rekombinantního viru v buněčných liniích, popsáných v příkladu 6. Výsledky standardního biostanovení, popsáného v příkladu 2, ukazují, že virus obsahující UAS_{GAL}-p74 je neinfekční vůči hmyzu, je-li podáván orálně. Když se však tento virus pěstuje v GAL4 komplementační buněčné linii, je při orálním podávání infekční.

P ř í k l a d 14

Izolace funkčního analogu AcMNPV p74 genu z genomu granulózního viru

Izolace genu odpovědného za orální infekčnost granulózního viru se vhodně provede využitím techniky "marker rescue" /Passarelli, A. L., a Miller, L. K., J. Virology, 67, 2149-2158 (1993)/. Nejprve se z virové DNA Trichoplusia ni granulózního viru (TnGV) připraví částečným štěpením Sal I fragment Sal I TnGV DNA. Tento fragment se liguje do kozmidového vektoru pVK102 /Knauf, V. C., a Nester, E. W., Plasmid, 8, 45-54 (1982)/ a tím se vytvoří genomová knihovna překrývajících se kozmidových klonů. Alikvótní část jednoho z CpGV kozmidových klonů (o hmotnosti 1 µg) se dohromady s 1 µg AcMNPV A4000 virové DNA transfekuje do buněk způsobem popsáným v příkladu 1. Po 5

dnech se provede standardní plaková zkouška. Po plném vyvinutí se jednotlivé plaky použijí k infikování jednotlivých jamek tkáňové kultivační plotny s 48 jamkami, jak je popsáno v příkladu 1. Vypěstovaný virus z těchto jamek se shromáždí do skupin po dvaceti. Tento virus se podává s potravou larvám *Trichoplusia* ni ve třetím instarstadiu při stanovení na terčících listů, popsaném v příkladu 2. Jestliže kozmidový klon obsahuje funkční analog genu p74, orální infekčnost viru A4000 zůstane zachována. Specifický gen odpovědný za zachování infekčnosti se identifikuje opakováním kotransfekce a testovacího postupu s plazmidovými subklony pozitivního kozmidu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantní hmyzí virus s omezenou schopností šířit se v životním prostředí z hostitele na hostitele, který je učiněn neinfekčním vůči hmyzu změnou svého genetického základu a jehož infekčnost je obnovena komplementací s produktem nebo funkcí, která v tomto změněném viru chybí nebo je defektní.

2. Virus podle nároku 1, zvolený ze skupiny skládající se z DNA a RNA virů.

3. Virus podle nároku 2, zvolený ze souboru DNA virů zahrnujícího viry Eubaculovirinae, Nudibaculovirinae, Entomopoxvirinae, Ichnovirus, Bracovirus, Iridoviridae a Parvoviridae.

4. Virus podle nároku 3, z čeledi Eubaculovirinae, je vybraný ze skupiny zahrnující jaderné polyedrální viry a granulózní viry.

5. Virus podle nároku 1, v němž změna genetického základu spočívá buď v odstranění funkce genu nebo v interferenci s virovou funkcí.

6. Virus podle nároku 1, jehož infekčnost se obnoví produkcí viru:

a) v hmyzích buňkách transfekovaných fragmentem DNA, který poskytuje produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve změněném viru;

b) v buněčných liniích, které byly stabilně transformovány fragmentem DNA, který poskytuje produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve

změněném viru;

c) v transgenních hmyzích jedincích, kteří obsahují fragment DNA poskytující produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve změněném viru.

7. Virus podle nároku 6, v němž se pro řízení exprese daného fragmentu DNA použije heterologní promotor.

8. Virus podle nároku 1, který dále obsahuje heterologní gen, kódující látku s potlačujícími nebo modifikačními účinky na hmyz, přičemž tento gen je vložen do virového genomu.

9. Virus podle nároku 8, v němž je látka s potlačujícími nebo modifikačními účinky pro hmyz zvolena ze skupiny zahrnující toxiny, neuropeptidy a hormony a enzymy.

10. Virus podle nároku 8, přičemž heterologní gen se vloží:

a) přímo na místo změny genetického základu viru;
nebo

b) na místo, přiléhající k místu změny genetického základu viru takovým způsobem, že segregace heterologního genu a změněného genetického základu se vyskytuje u virového potomstva v méně než 10 % případů.

11. Způsob výroby hmyzího viru se sníženou schopností šířit se v životním prostředí z hostitele na hostitele, vyznačující se tím, že zahrnuje tyto kroky:

a) výrobu viru neinfekčního pro hmyz změnou genetického základu viru; a

b) obnovení infekčnosti viru komplementací s produktem nebo funkcí, které ve změněném viru chybějí nebo jsou defektní.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že změna genetického základu viru se způsobí buď odstraněním funkce genu nebo interferencí s virovou funkcí.

13. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že infekčnost viru se obnoví produkcí viru:

a) v hmyzích buňkách transfekovaných fragmentem DNA, který poskytuje produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve změněném viru;

b) v buněčných liniích, které byly stabilně transformovány fragmentem DNA, který poskytuje produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve změněném viru;

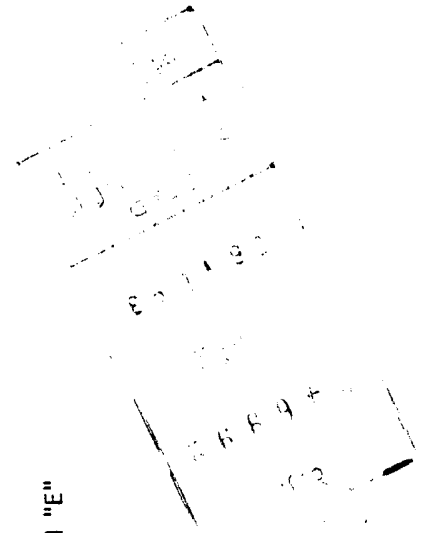
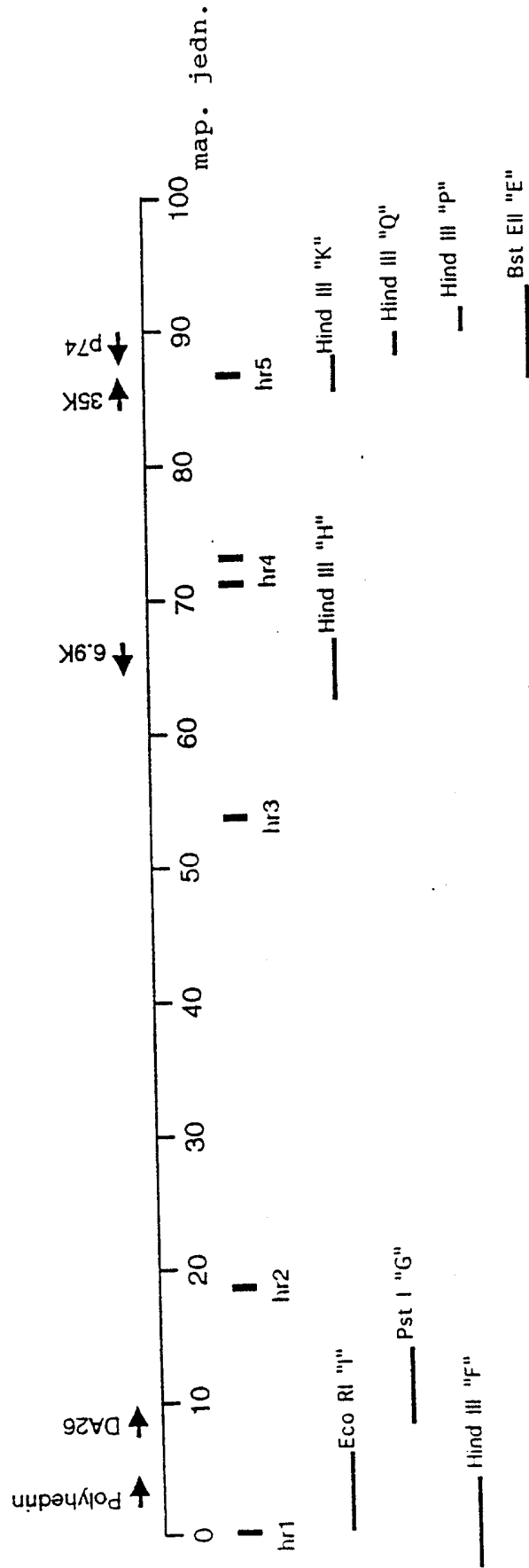
c) v transgenních hmyzích jedincích, kteří obsahují fragment DNA poskytující produkt nebo funkci, které chybějí nebo jsou defektní ve změněném viru.

14. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje použití heterologního promotoru.

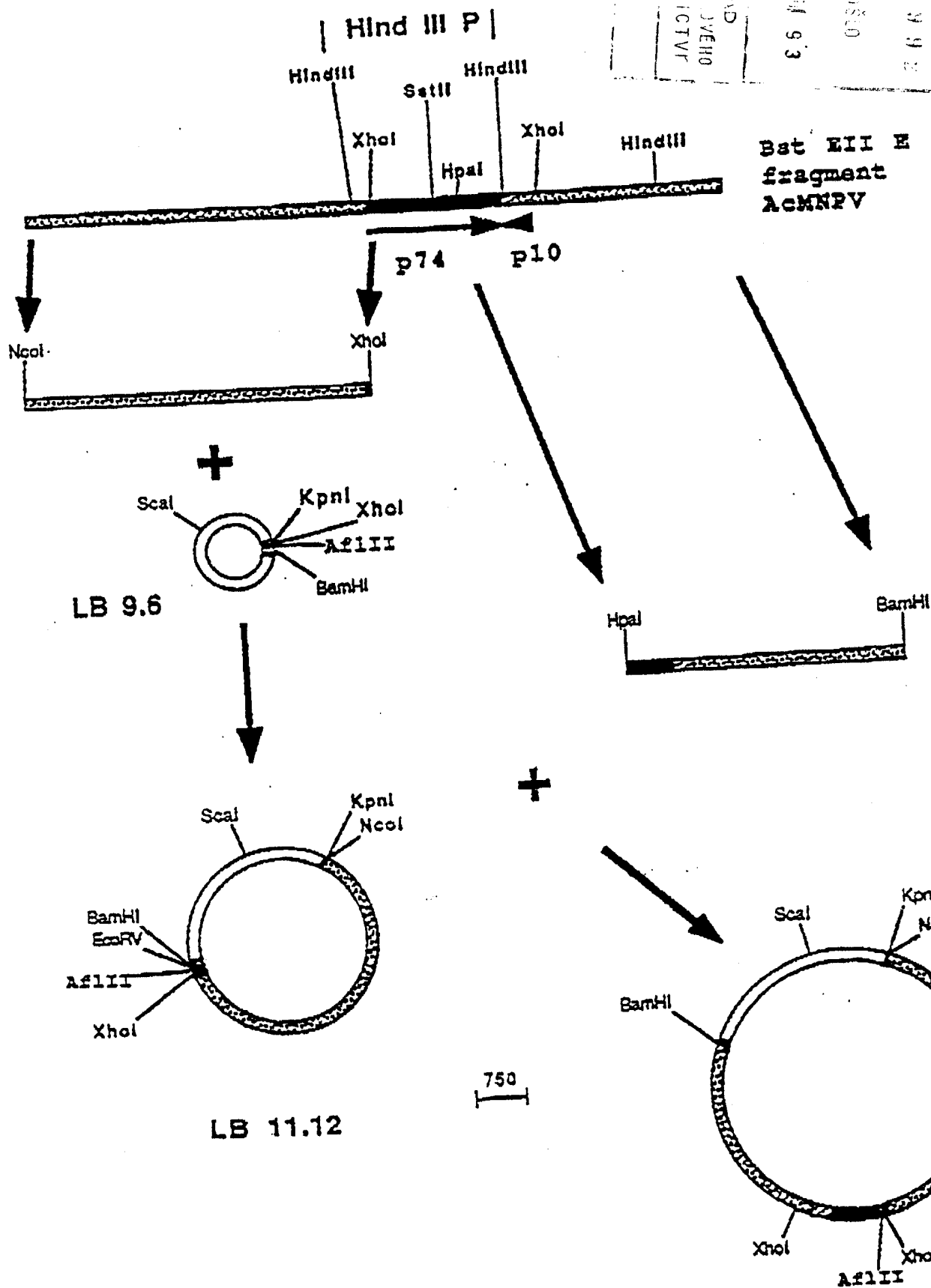
15. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje použití heterologního genu, který se vloží do virového genomu a který kóduje látku s potlačujícími nebo modifikačními účinky na hmyz.

Obr. 1

GENY ACMNPV (E2)



PRIL	U RAD	0 6 VII 93	0 4 6 9 9 2	1 0 8 2 0
	PROJEKTOVANO			
	VLASTNOSTI			

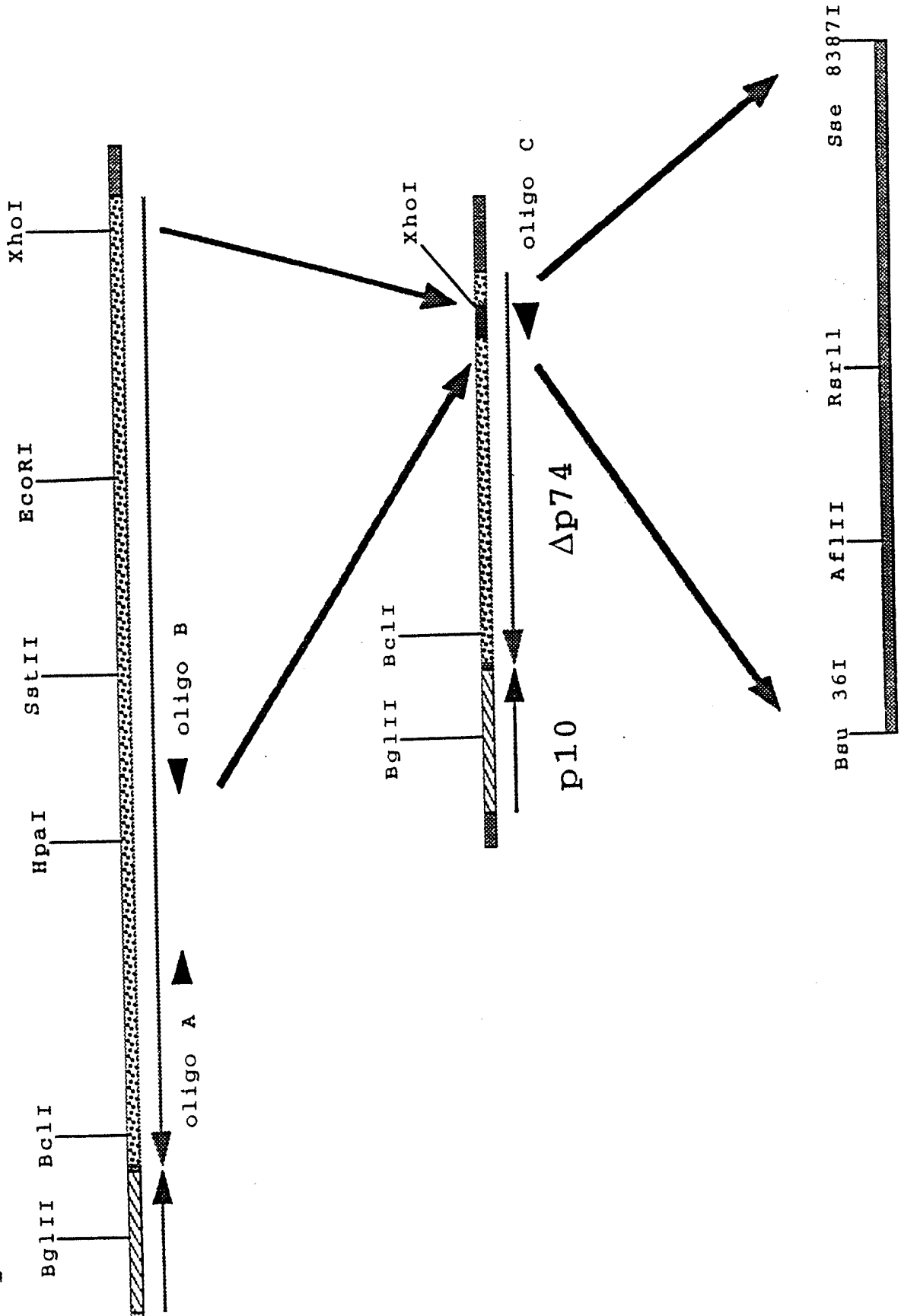


Obr. 3

PRŮL	URAD	0 6 MA 9 0
VLAS NICTV	PRON. OJVEHO	0300
		2 6 6 9 4 0

p74

p10



Obr. 4

