

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037143**

(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в описании: стр.9

(48) Дата публикации исправления
2021.03.11, Бюллетень №3'2021

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.10

(21) Номер заявки
201500185

(22) Дата подачи заявки
2013.07.10

(51) Int. Cl. *A01N 57/10* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)
A01P 7/00 (2006.01)
A01P 13/00 (2006.01)
A01N 57/16 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ,
ПАТОГЕННЫХ ИЛИ ИНВАЗИВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ
ИНГИБИРОВАНИЯ И/ИЛИ КОНТРОЛЯ РОСТА УКАЗАННЫХ СИСТЕМ, И СПОСОБ
ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) NA2012A000046

(32) 2012.08.02

(33) IT

(43) 2015.07.30

(86) PCT/IT2013/000193

(87) WO 2014/020624 2014.02.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОУ СЕЛФ С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Маццолени Стефано (IT)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2011112570
WO-A1-2005049841

(57) Настоящее изобретение относится к смеси фрагментов ДНК для профилактики или обработки против по меньшей мере одного патогенного, паразитического или заражающего вида для растений или окружающей среды, где указанная тотальная ДНК состоит из случайных фрагментов тотальной ДНК указанного по меньшей мере одного патогенного, паразитического или инвазивного вида и/или по меньшей мере одного филогенетически похожего вида, против которого направлены указанные профилактика и обработка.

B9

037143

037143

B9

Настоящее изобретение касается композиций нуклеиновых кислот паразитических, патогенных или инвазивных биологических систем для ингибирования и/или контроля указанных систем и способа ее получения. Также изобретение касается способа и связанной системы, позволяющих улучшить выработку/рост микроорганизмов с высоким выходом в биореакторах или фотобиореакторах или растений в различных культуральных системах путем удаления нуклеиновых кислот, выработанных указанными организмами.

Предшествующий уровень техники

Уже много лет исследование новых продуктов, ингибирующих биологические системы, требует огромных научных, экономических и промышленных усилий и включает обнаружение активных веществ из природных источников или полученных синтетическим путем и последующие биологические и фармакологические тесты, как *in vitro* так и *in vivo*, в дополнение к тестам в полевых условиях и в клинических условиях (Morgan et al. 2011. Health Policy, 100:4-17).

Использование специальных средств (пестицидов, гербицидов, антибиотиков) для ингибирования биологических систем касается различных областей применения, среди которых главным образом представлены сельскохозяйственные и медицинские, осуществляется для контроля, ингибирования или устранения опасных организмов, будь то патогенных, паразитических или инвазивных, а также для обработки против образования микробных биопленок.

Несмотря на широту и многообразие такого диапазона приложений, применение специальных средств демонстрирует общие проблемы, такие как (i) специфичность действия, (ii) возможная токсичность для человека и других видов, (iii) загрязнение окружающей среды и (iv) возникновение устойчивостей в популяциях организмов-мишеней.

Как правило, специальные средства (пестициды, гербициды, антибиотики) состоят из малых и среднеразмерных органических молекул и демонстрируют большое многообразие как по химическим компонентам, так и по механизмам действия. Такие препараты были обнаружены главным образом с помощью способов "случайного скрининга", то есть путем оценки активности и потенциальной возможности применения химических соединений, полученных случайным синтезом, начиная с различных основных структур, полученных на основе природных каркасов. Соответственно в течение последних 50 лет на рынок было выведено очень большое количество продуктов, среди которых совсем недавно также появились полинуклеотиды.

Одна из основных проблем, связанных с текущими активными веществами, используемыми в сельском хозяйстве и медицине, заключается в недостаточной специфичности действия их на паразитические, патологические и/или заражающие организмы и, следовательно, заключается в побочных эффектах и токсичности для организма-хозяина. Например, известны случаи, когда возникновение болезни Паркинсона связано с паракватом, и случаи продуктов, которые являются доказано летальными для человеческих эмбрионов. В дополнение к проблемам острой токсичности постоянное воздействие некоторыми продуктами демонстрирует признанный риск канцерогенности, для чего требуются усиленные нормы экотоксикологического мониторинга и применение способов воздействия, ассоциированных с динамикой в окружающей среде и устойчивостью различных продуктов.

И наконец, нельзя игнорировать проблему загрязнения окружающей среды, вызванного специальными средствами (пестицидами, гербицидами, антибиотиками). Недавние применения правил в области защиты окружающей среды резко уменьшили санкционирование использования фитопрепаратов и пестицидов, а в ближайшем будущем от многих продуктов откажутся при вступлении в силу более строгих правил. Например, метилбромид, широко используемый в качестве фумиганта для контроля патогенов в почве, в том числе нематод, был запрещен из-за включения его в число соединений, рассматриваемых в качестве ответственных за повреждение озонового слоя.

С учетом этих проблем основная часть более современных активных веществ выбиралась по параметру их быстрого разложения в почве или сельскохозяйственных культурах. Однако это возможное преимущество по показателю загрязнения окружающей среды может ограничить эффективность с течением времени использованных активных веществ.

Другая общая фундаментальная проблема для используемых в настоящее время продуктов, как в области сельского хозяйства, так и в области медицины при терапевтических применениях, заключается в появлении фармакологической устойчивости через некоторое время после начала обработки.

Например, что касается сельского хозяйства, то в США в начале шестидесятых, 2,4 D был первым широко используемым гербицидом, для которого сообщалось о возникновении устойчивости в популяции *Dacus carota* (Switzer, (1957), Proc. North Eastern Weed Cont. Conf., 11:315; Whitehead and Switzer, (1963), Can. J. Plant Sci., 43:255). Постепенно, начиная с начала 70-х, сообщалось о многочисленных случаях устойчивости заражающих видов к триазинам (Ryan, (1970), Weed Sci., 18:614; LeBaron and Gressel, Eds., Herbicide Resistance in Plants, Wiley, New York, 1982). Затем в следующие десятилетия сообщения росли экспоненциально вместе с распространением новых продуктов для химической и биологической борьбы и их интенсивным применением (Powles and Shaner, 2001. Herbicide resistance and world grains, CRC press, New York).

Известны различные механизмы возникновения устойчивости заражающих видов к обработке гер-

бицидами. Например, в литературе сообщалось о различных механизмах: устойчивости в результате отбора множества копий генов-мишеней (Gaines et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. 107(3): 1029-1034); мутации генов-мишеней (Wakelin et al. 2006. Weed Res. (Oxford), 46(5): 432-440); вакуолярной секвестрации (Ge et al. 2010. Pest Management Sci. 66:576); экспрессии ферментов, которые метаболизируют гербициды (Hidayat et al. 1997. Pest. Biochem. Physiol. 57(2): 137-146).

В настоящее время в области сельского хозяйства обнаружено появление устойчивости более чем у 200 заражающих видов, отобранных главным образом в результате применения активных веществ, характеризующихся одинаковым механизмом действия. В Италии, на равнине По, известны случаи устойчивости к атразинам в популяции заражающих растений, таких как *Solarium nigrum*, *Chenopodium album* и *Amaranthus scuentus*, или в других регионах известны случаи устойчивости к ингибиторам ферментов в различных других заражающих видах (*Lolium spp*, *Phalaris paradoxa*, *Papaver rhoeas*, *Sinapis arvensis*, *Echinocloa crus-galliums*, *Sorghum halepense*, *Cyperus difformis*).

В области медицины развитие устойчивости к лекарственным средствам делает бесполезным их применение, что представляет собой одну из наибольших проблем, связанных с лечением антибиотиками (Clatworthy et al. 2007. Nat. Chem. Biol. 3(9): 541-548). Несмотря на то, что использовались огромные человеческие и экономические ресурсы для открытия новых молекул и для исследования механизмов устойчивости, появление устойчивости к препаратам происходило быстрее, чем открытие новых препаратов.

Проблема устойчивости к препаратам стала основной всемирной в области здравоохранения, поскольку следствием устойчивости являются клинические осложнения после терапии антибиотиками (увеличение длительности заболевания, рост осложнений, вероятность эпидемий) и необходимость дополнительных затрат при лечении инфекций с устойчивыми к антибиотикам бактериями (путем использования других препаратов, что приводит, таким образом, к увеличению периода госпитализации). Случаем устойчивости к антибиотикам, который все чаще и чаще проявляется, является опасным для общественного здравоохранения и представляет одну из основных причин внутрибольничных инфекций, является устойчивость к метициллину у стафилококков, а главным образом различных штаммов *Staphylococcus aureus*. Эти бактерии с помощью механизма пониженной аффинности для мишени способны экспрессировать модифицированный белок, который не взаимодействует с бета-лактамами антибиотиками. Европейский Союз, столкнувшийся с этой проблемой, представил "Общинную Стратегию против устойчивости к антибиотикам", в которой рекомендуется осмотнительное применение в медицине антимикробных агентов для сдерживания развития устойчивостей.

Возможность ингибирования экспрессии специфических генов представляет собой большой интерес со времени первой публикации работы Zamesnik и Stephenson, в которой показано, что применение композиций, основанных на антисмысловых олигонуклеотидах (ASO), способно ингибировать трансляцию вирусных белков (Zamesnik and Stephenson (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:285-288). После этого открытия большинство недавних экспериментальных работ по методам борьбы с паразитарными, патогенными и заражающими агентами также включали исследование применения различных малых молекул РНК и/или ДНК (порядка десятков оснований), селективно связывающихся с мишенями, демонстрирующими комплементарные последовательности, такими как мРНК, микроРНК или митохондриальная РНК, ингибируя, таким образом, их трансляцию и, следовательно, осуществляя контроль активности видов мишеней.

Эти современные методологии нашли применение в борьбе против паразитных видов (например, в 2005/049841 A1), заражающих растений (например, WO 2011/11257 A1) и при антимикробной в онкологической терапии.

Используемые в настоящее время подходы разнообразны, и среди них модификация РНК для контроля уровня специфического РНК-мессенджера, что приводит к ограничению экспрессии гена, кодирующего данную РНК. Такая методология характеризуется введением с помощью подходящих конструкций последовательности РНК или ДНК, нацеленной на специфическую мишень, например ген или его часть. Проблемы, связанные с применением таких терапевтических подходов, включают необходимость описания специфической последовательности в качестве терапевтической мишени. Также сложно получить эффективную минимальную концентрацию конструкта в органе-мишени. Последняя история антисенс-технологии, кроме того, показала, что, хотя идентификация ASO, связывающих специфические РНК, в настоящее время относительно простая, включение их в композиции, демонстрирующие потенциал эффективного применения по ингибированию экспрессии специфических генов, все еще остается проблематичным. Различные недавние исследования, адресованные указанной проблеме, предлагают более стабильные и эффективные структуры и композиции (например, в WO 2011/031520 A1). Как хорошо известно, этот тип методов демонстрирует повышенную селективность по показателю специфичности участка действия. Вплоть до настоящего времени о случаях возникновения устойчивости при применении ASO при гербицидной и пестицидной обработке не сообщалось, поскольку их применение все еще не достигло стадии коммерциализации и последующей диссеминации продуктов. Однако, принимая во внимание специфичность конкретного действия ASO, реалистично предположить, что в результате интенсивного применения и последующего селективного давления на заражающие паразитарные и/или

патогенные популяции применение указанных ASO приведет к возникновению устойчивостей в обработанных популяциях, что сделает неэффективными обработки так же, как это происходило в прошлом с другими типами препаратов, характеризующихся повышенной специфичностью действия.

В области производственных культур в биореакторах и фотобиореакторах и, следовательно, в ограниченных контролируемых системах одной из еще не решенных основных проблем производственных культур микроорганизмов является возникновение феномена насыщения кривой роста указанных организмов (стационарная стадия) с последующей невозможностью превысить определенные концентрации на единицу объема.

Типичная кривая роста таких микроорганизмов (бактерий, фотосинтетических бактерий, дрожжей, микроводорослей и сине-зеленых водорослей) характеризуется начальной латентной стадией, последующей экспоненциальной стадией и стационарной стадией с насыщением кривой роста, за которыми иногда следует стадия клеточной смерти.

Невозможность превзойти порог максимальной концентрации на единицу объема, которую может достичь микроорганизм в культуре большого масштаба в реакторах и системах промышленного культивирования, значимо ограничивает потенциал эксплуатации таких организмов, не позволяя осуществить скрытые возможности увеличения выработки после стационарной стадии.

Различные факторы предложены в качестве причины снижения скорости клеточного роста микроорганизмов в стадии насыщения, все главным образом связанные с ограничением питательных элементов в среде или автоограничением при проникающем излучении в культуре в случае фотосинтетических организмов (феномен самозатенения). Различные экспериментальные исследования продемонстрировали, что феномен насыщения кривой роста происходит также в отсутствие очевидных лимитирующих факторов, и этот феномен ассоциирован с накоплением ингибирующих веществ в культуральной среде.

В свете вышеуказанного, следовательно, очевидна потребность в новых способах ингибирования опасных организмов или повышении выхода технологических процессов микроорганизмов, преодолевающих недостатки способов предшествующего уровня техники.

Настоящее изобретение является результатом важного наблюдения, осуществленного во время экологических исследований цикла органического вещества в почве. В этих исследованиях было отмечено, что ДНК, высвобожденная при разложении органического материала, аккумулированного почвой, оказалась ингибирующей для растительных видов, вырабатывающих указанный органический материал, при этом указанная ДНК не ингибирует другие виды, для которых указанная ДНК напротив может выполнять роль питательного источника.

В случае лесных экосистем этот ингибирующий эффект специфической внеклеточной ДНК только на видах растений с гомологичной ДНК представляет регулирующий механизм естественного сосуществования среди различных видов и поддерживает биоразнообразие растительных сообществ. Фактически, когда одиночные виды по любой причине находятся в условиях, подходящих для увеличения собственного доминирования над другими видами, со временем они неизбежно будут аккумулировать большее количество остатков собственного органического вещества, чье разрушение и последующее высвобождение ДНК будут оказывать ингибирующий эффект на тот же вид, таким образом, снижая способность к конкуренции и, следовательно, доминированию. На том же феномене основана так называемая "усталость почвы" (также называемая "истощением почвы") в сельском хозяйстве, то есть потеря продуктивности неоднократно выращенных моноспецифических культур, не являющаяся результатом проблем питательности, но являющаяся следствием накопления растительных остатков того же самого растения. Наблюдение видоспецифичного ингибирования из-за накопления собственной ДНК в течение цикла органического вещества объясняет вышеупомянутые феномены потери продуктивности, и указанная находка ранее не сообщалась в научной литературе.

На основании этих исследований был достигнут второй важный результат, состоящий в наблюдении того, что микробные популяции (например, бактерии, микроводоросли и грибы) продуцируют и секретируют в ходе роста молекулы собственной ДНК в форме фрагментов различного размера, которые при накоплении в ростовом субстрате популяции проявляют ингибирующий эффект на рост указанной популяции.

Известно, что микробная популяция, как правило, изначально растет экспоненциально, а затем входит в так называемую стационарную стадию, продолжающуюся, возможно, стадией смерти. Известны различные лимитирующие рост факторы таких микробных популяций, среди которых в основном ограничения по питательным веществам и/или накопление токсичных веществ различной природы. В литературе сообщалось о выработке и секреции внеклеточной ДНК из различных организмов (Peters and Pretorius, 2011. *Chemical Clinics Acta*. 412:806-811), однако вплоть до настоящего времени не сообщалось о том, что высвобождение внеклеточной ДНК в ходе роста микробной популяции продуцирует ингибирующий эффект на рост указанной популяции, абсолютно аналогичным способом, как наблюдалось для растений, пораженных накоплением собственной ДНК в почве. Наблюдения, лежащие в основе данного изобретения, выявили общий биологический закон, согласно которому высвобождение собственной ДНК организмом регулирует рост указанного организма и организмов популяции того же вида. Этот результат приводит к новым примечательным прикладным сценариям в агрофармацевтической области. В частно-

сти, становится возможным контроль любых вредных видов воздействием собственной тотальной, случайно фрагментированной ДНК, для воспроизведения того, что наблюдается в естественных циклах разрушения органического вещества или в феномене внеклеточной секреции в ходе роста микробных популяций. Таким образом, высказана гипотеза о возможном прикладном использовании композиций, чье активное вещество состоит из тотальной и случайно фрагментированной ДНК контролируемых видов.

Тесты, представленные ниже, демонстрируют эффективность такого способа для любых обрабатываемых видов. Представленные эксперименты легко воспроизводимы и не требуют какого-либо априорного знания генома подлежащего обработке вида, полученного секвенированием и/или детекцией специфических целевых генов. Для подготовки ингибирующих композиций достаточными являются экстракция тотальной ДНК из органического материала видов-мишеней (например, из листьев растений, мицелия грибов, микробной биомассы) и последующая случайная фрагментация указанной экстрагированной ДНК. Оригинальная процедура симулирует процесс естественного разрушения органического вещества в почве и продуцирует смесь различных по размеру полинуклеотидов, содержащих от десятков до тысяч оснований. Такие фрагменты, представляющие тотальную ДНК контролируемых видов, оказывают чрезвычайно селективное влияние на организмы с гомологичной ДНК, с учетом того, что действуют не на одиночный целевой ген, как это происходит в случае различных типов бессмысленных олигонуклеотидов. Этот аспект потенциально представляет собой значимое преимущество, поскольку устраняет возможность появления устойчивостей в обработанных популяциях из-за того, что ни один организм не способен развить одновременно устойчивости к ингибированию всех собственных функций. Фактически известно согласно научной литературе, что скорость возникновения феноменов устойчивости в популяциях паразитарных, патогенных и заражающих агентов тесно коррелирует с количеством генов, ответственных за такую устойчивость. Точнее, чем меньше количество генов, необходимых для проявления устойчивости, тем больше скорость, с которой эта устойчивость будет положительно отобрана внутри контролируемой популяции (Prather et al. the 2000. *Herbicide resistance: definitions and management strategies*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland - Brent and Hollomon, 2007. *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?* CropLife International, Brussel).

Таким образом, изобретение касается применения композиций для ингибирования паразитарных, патогенных и/или заражающих видов, в которых в качестве активного вещества используются случайные фрагменты тотальной собственной ДНК, идентичной или схожей с геномом ингибируемых видов. Кроме того, настоящее изобретение касается композиции, содержащей указанные случайные фрагменты тотальной ДНК.

Кроме того, авторы настоящего изобретения разработали способ и связанную систему для выработки/роста микроорганизмов в биореакторах или фотобиореакторах или растений в системе гидропонной культуры, на субстратах вне почвы или в почве, с помощью отделения нуклеиновых кислот указанных микроорганизмов или растений.

Ниже в текущей патентной заявке термин "уровень насыщения" означает стадию, установившуюся в ходе роста микроорганизмов, когда концентрация нуклеиновых кислоты или их фрагментов в культуральной среде такова, что приводит к стационарной стадии относительно хода роста микроорганизмов, с насыщением их кривой роста.

Таким же образом термин "истощенная среда" означает культуральную среду, в которой уровень концентрации нуклеиновых кислот и их фрагментов достигает концентрации, приводящей к уровню насыщения на кривой роста микроорганизмов.

Что касается термина "восстановление", то он означает операцию, подходящую для удаления нуклеиновых кислот и их фрагментов из истощенной среды.

"Регенерированная среда" означает среду, полученную после восстановления истощенной среды.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на экспериментальном доказательстве того, что воздействие на организм экстракта тотальной собственной ДНК приводит к ингибирующему эффекту на функции указанного организма путем ограничения роста или нарушения фундаментальных путей физиологии на клеточном уровне.

Если говорить более подробно, то тотальная ДНК паразитного, патогенного и/или заражающего организма, экстрагированная и введенная без отбора специфических фрагментов или применения специфических конструкторов, может быть использована в качестве ингибирующего продукта для того же организма или других организмов с идентичным или схожим геномом. Ингибирующее действие проявляется, когда паразитарные, патогенные и/или заражающие виды контактируют в их ростовом субстрате или на системном уровне со случайно фрагментированной тотальной собственной ДНК. Единоразово абсорбированная, такая ДНК дает ограничивающий эффект на рост и общий ингибирующий эффект на различные функциональности организма, отличные от тех, что происходят в случае применения специфических нуклеотидных последовательностей для эффектов "генного сайленсинга" или "РНК-интерференции". Абсорбция и ингибирующая активность зависит от уровня концентрации и фрагментации нуклеиновых кислот, которым экспонирована система. Отмечено, что больший эффект зависит от степени фрагмента-

ции использованных молекул (например, после обработки ультразвуком или последующего естественного разрушения). Эксперименты проводили с использованием различных средних длин фрагментов ДНК, и ингибирующий эффект оказался более сильным для смесей фрагментов с наиболее встречаемой длиной примерно 200 оснований.

В частности, для демонстрации того, что метод фрагментации не влияет на эффективность ингибирующего эффекта, с помощью различных подходов были получены случайные фрагменты тотальной ДНК, экстрагированной из различных видов. Указанная фрагментация может быть проведена путем естественной деградации (экспонирование факторам окружающей среды), искусственной деградации (сжиганием, ферментативным или механическим способом) или синтеза (способы случайной амплификации, такие как DOP, т.е. ПЦР с вырожденными олигонуклеотидами).

Авторы настоящего изобретения провели исследования на растениях, грибах, насекомых, дрожжах, водорослях и простейших. Результаты таких экспериментов недвусмысленно демонстрируют повсеместное существование описанного ингибирующего эффекта на любом обработанном виде.

В случае растений водный раствор тотальной видовой ДНК, полученной простой экстракцией и случайно фрагментированной, а также в низкой концентрации, при контакте с корнями того же вида быстро продуцирует радикальный некроз, хлороз листьев, прерывание активности меристемы, а при контакте с семенами - подавление способности к прорастанию. Напротив, воздействие на корни и/или семена вида раствором случайно фрагментированной тотальной ДНК другого вида не дает заметного ингибирования, также как и воздействие высокой концентрацией, т.е. демонстрируется сильный видоспецифичный эффект. Следовательно, очевидно, что наличие случайно фрагментированной тотальной ДНК в ростовой среде может привести к селективной ингибирующей функции на организмы с идентичным или схожим геномом, не влияя на другие виды. Можно обнаружить этот ингибирующий эффект как при включении ДНК, искусственно фрагментированной и внесенной в ростовую среду биологической системы, так и продуцировании и секреции ДНК указанной биологической системой в ходе ее роста.

Таким образом, данный эффект позволяет оказывать воздействие только на паразитический, патогенный и/или заражающий вид, обработкой составами, содержащими ДНК, специфичную для этих видов, с огромным преимуществом, которое заключается в том, что указанные молекулы будут демонстрировать ингибирующий эффект только на вид-мишень, но не на защищаемый или другие виды, а также в возможности повторных воздействий.

Принцип, аналогичный наблюдаемому авторами настоящего изобретения, может быть благоприятно использован для повышения выхода процессов продукции микроорганизмов в биореакторах и фотобиореакторах, емкостях для гидропонной культуры и в культуральных системах вне почвы. Фактически авторы настоящего изобретения с помощью лабораторных тестов с использованием биореакторов для выращивания водорослей, дрожжей и бактерий, наблюдали накопление в супернатанте фрагментов ДНК различных размеров (примерно, 50-800 п.о.), принадлежащей к вырабатываемым микроорганизмам, в ходе стадий роста при повышенных концентрациях. Было отмечено, что такое накопление происходило в стадиях роста при повышенных концентрациях и что это приводило к ингибирующему воздействию на рост указанной культуры при достижении в биореакторах стационарной стадии и последующей стадии смерти (фиг. 11А и В).

Экспериментальные тесты указывают на то, что самоингибирующий видоспецифичный эффект существует, поскольку культуры данных видов демонстрируют ингибирование только супернатантами культур того же вида. Кроме того, было отмечено, что удаление ДНК из культуральной среды соответствует удалению ингибирующего эффекта, что позволяет восстановить стадию роста и достичь большей плотности клеток в биореакторах (фиг. 11С).

Аналогично в емкостях для гидропонных культур растений при пониженной выработке в отсутствии полной замены циркулирующего питательного раствора было отмечено накопление в субстрате ДНК культивируемых видов. Также в данном случае удаление накопленной ДНК из ростового субстрата позволяет восстановить продуктивность.

Принимая во внимание эти экспериментальные результаты, следовательно, возможно разработать технологические системы для удаления ДНК, появляющейся в клеточных культурах (биореакторы и фотобиореакторы), емкостях гидропонных культур и в культуральных системах вне почвы для оптимизации продуктивности.

Следовательно, конкретной задачей настоящего изобретения является применение композиции, содержащей или состоящей из смеси фрагментов тотальной ДНК, где указанная тотальная ДНК является случайно фрагментированной, для профилактики или для обработки против по меньшей мере одного патогенного, паразитарного или заражающего вида растений или окружающей среды, где указанная тотальная ДНК является тотальной ДНК указанного патогенного, паразитарного или заражающего вида и/или по меньшей мере одного филогенетически схожего вида, против которого направлена указанная профилактика и обработка. Как указано выше, фрагментная смесь по настоящему изобретению получена фрагментацией тотальной ДНК, экстрагированной из указанных патогенных, паразитарных или заражающих видов, против которого указанная профилактика и обработка направлены, без проведения какого-либо отбора фрагментов, то есть с использованием всех фрагментов, полученных из нуклеиновой ки-

слоты. Поэтому согласно настоящему изобретению используется случайно фрагментированная цельная ДНК, то есть без проведения какого-либо отбора специфических и/или специфически отобранных по размеру последовательностей. Фрагменты указанной тотальной ДНК получают с помощью случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов из тотальной ДНК. Существенное отличие метода настоящего изобретения по сравнению с текущими методами "генного сайленсинга" и "РНК-интерференции" заключается в том, что на существующем уровне техники специфические области используемых нуклеиновых кислот должны быть активно выбраны, тогда как в случае метода настоящего изобретения не нужно ни предшествующей информации, ни отбора используемых специфических последовательностей. Указанная тотальная ДНК может быть экстрагирована из указанного по меньшей мере одного патогенного, паразитарного или заражающего вида или искусственно синтезирована. Нуклеиновая кислота может быть амплифицирована и/или фрагментирована химической и/или физической процедурами, и полученные фрагменты, возможно, могут быть дополнительно амплифицированы. Способы получения случайных фрагментов тотальной ДНК включают, например, химический, биохимический и молекулярный способы, методы обработки ультразвуком, тепловые обработки и процедуры пиролиза. Например, после экстракции тотальной ДНК из ткани листьев *Arabidopsis thaliana*, воздействие на семена этого же вида экстрактом, содержащим ДНК в нефрагментированной форме, не демонстрирует значимые ингибирующие эффекты. В ином случае после обработок экстракта ультразвуком с помощью погружного соникатора в течение трех или четырех циклов, длящихся в течение трех минут при 80% мощности, получается смесь различных по размеру случайных фрагментов с растущей ингибирующей активностью на прорастание семян *A. thaliana*, которая находится в зависимости от достигнутой степени фрагментации. Та же смесь случайных фрагментов тотальной ДНК, экстрагированной из *A. thaliana*, не демонстрирует ингибирующий эффект на другие обработанные виды, такие как *Lycopersicon esculentum* и *Avena sativa* (использованных в этом эксперименте в качестве контрольного биотеста). Аналогичные результаты наблюдались, когда экстракт тотальной ДНК случайно фрагментировали с помощью других указанных химико-физических способов. И наконец, такие же результаты получены при воздействии на семена *A. thaliana* смесями случайных фрагментов тотальной ДНК, где указанные фрагменты были получены амплификацией тотальной ДНК с помощью DOP. Композиция может быть использована в качестве биоцида, гербицида, фунгицида, инсектицида, акарицида, нематоцида, антипротозойного агента, альгицида, бактерицида. Композиция может быть введена указанному по меньшей мере одному патогенному, паразитарному или заражающему виду при поверхностном контакте, цитотрофном введении, системном введении посредством, например, инъекции, проглатывания, или ингаляции, или адсорбции. Композиция может быть составлена в форме для сухой или жидкой обработки, выбранной из группы, состоящей из дисперсии, например в форме аэрозоля, суспензии, смачиваемых или растворимых порошков, эмульсий в воде или другом растворителе, диспергируемых гранул, суспензий микрокапсул, эмульгируемых концентратов, текучих паст, макроэмульсий, масляных дисперсий, приманок. Согласно конкретному воплощению случайные фрагменты нуклеиновых кислот могут быть включены в векторы. Композиция по настоящему изобретению может включать дополнительные пестициды, выбранные из группы, состоящей из фунгицидов, инсектицидов, нематоцидов, майтицидов, артропцидов, бактерицидов, альгицидов.

Изобретение также касается способа профилактики или лечения от по меньшей мере одного патогенного, паразитарного или заражающего вида для растений или окружающей среды, где указанный способ включает или состоит из следующих стадий: а) экстракция тотальной ДНК по меньшей мере одного патогенного, паразитарного или заражающего вида, против которого направлены указанная профилактика и лечение; б) получение случайных фрагментов указанной тотальной ДНК в целях получения смеси случайных фрагментов ДНК; и с) контакт указанной смеси случайных фрагментов с указанными патогенными, паразитарными или заражающими видами.

Композиция, содержащая или состоящая из смеси случайных фрагментов тотальной ДНК, для применения при профилактике и лечении по меньшей мере против одного патогенного, паразитарного или заражающего вида человека или животного, где указанная тотальная ДНК является ДНК указанного по меньшей мере одного патогенного, паразитарного или заражающего вида, против которого указанные профилактика и лечение направлены, является другой задачей настоящего изобретения. Указанные случайные фрагменты тотальной ДНК могут быть получены деградацией тотальной ДНК с помощью химических и/или физических способов или синтезом случайных фрагментов указанной тотальной ДНК. Композиция по настоящему изобретению может быть составлена для сухой или жидкой обработки или аэрозольной дисперсии, в форме суспензий, смачиваемых или растворимых порошков, эмульсий в воде или другом растворителе, диспергируемых гранул, суспензий микрокапсул, эмульгируемых концентратов, текучих паст и макроэмульсий, масляных дисперсий, кремов, капсул и таблеток. Пути введения включают контактный или поверхностный, системное и цитотрофное введение, с помощью инъекции, абсорбции, проглатывания и ингаляции, а также любого другого пути введения, пригодного для конечного применения. Композиция по настоящему изобретению может включать смеси с другими химическими соединениями, действующими в качестве повышающих клейкость агентов, смачивающих агентов, суспендирующих агентов, наполнителей, улучшающих агентов и растворителей, поверхностно-активных

агентов, а также других веществ, пригодных для конечного применения. И, наконец, композиция по изобретению может включать другие фармацевтические соединения в составах и смесях не антагонистических, но скорее синергических сред с лечебной активностью. В таких случаях комбинация соединений в общем будет соответствовать соотношению масс от около 0 до 100%.

Кроме того, специфической задачей настоящего изобретения является способ получения с высоким выходом микроорганизмов в биореакторах или фотобиореакторах или растений в культуральных системах как в почве, так и вне почвы, характеризуемый тем, что нуклеиновые кислоты организмов, продуцируемых указанным процессом, удаляются из культуральной среды, и культуральная среда, обедненная по указанной нуклеиновой кислоте, может быть использована опять в указанном способе.

Согласно способу изобретения нуклеиновые кислоты удаляют из культуральной среды или ростового субстрата с помощью методов разделения, выбранных из групп, состоящих из внешнего блока для удаления, предпочтительно состоящего из внешнего контейнера и системы для создания электрических, или магнитных, или электромагнитных полей, по меньшей мере одного канала и по меньшей мере одного перемещающего средства для экстракции концентрированных нуклеиновых кислот из предшествующей системы; интегрированного блока для удаления, предпочтительно состоящего из системы для создания электрических, или магнитных, или электромагнитных полей, по меньшей мере одного канала и по меньшей мере одного перемещающего средства для экстракции концентрированных нуклеиновых кислот из предшествующей системы, полностью интегрированного в этот же биореактор; методов, применимых *in situ* и во внешних блоках, предпочтительно методов центрифугирования; методов фильтрации; обработки ДНКазой и другими ферментами, деградирующими нуклеиновые кислоты; термообработки; подкисляющих обработок.

Предпочтительно согласно способу изобретения указанные нуклеиновые кислоты удаляются из культуральной среды с помощью по меньшей мере одного внешнего или интегрированного съемного блока биореактора, или фотобиореактора, или систем для гидропонной культуры с помощью методов, выбранных из группы, состоящей из применения статических электрических полей, применения статических магнитных полей, применения динамических магнитных и/или электрических полей, центрифугирования, фильтрации, обработки ДНКазой, термообработки, подкисляющей обработки.

Скрытым аспектом настоящего изобретения является система для получения микроорганизмов, включающая по меньшей мере один биореактор, или фотобиореактор, или систему для гидропонной культуры, по меньшей мере один блок для удаления нуклеиновых кислот, внешний по отношению к указанному одному биореактору, или фотобиореактору, или системе для гидропонной культуры, где указанный блок для удаления нуклеиновых кислот соединен с указанным по меньшей мере одним биореактором, или фотобиореактором, или системой для гидропонной культуры с помощью по меньшей мере одного первого канала и по меньшей мере одного первого перемещающего средства для удаления нуклеиновых кислот, содержащихся в культуральной среде, и по меньшей мере одного второго канала, и по меньшей мере одного перемещающего средства для повторного введения в указанный по меньшей мере один биореактор, или фотобиореактор, или систему для гидропонной культуры культуральной среды, из которых удалялись нуклеиновые кислоты; указанная система содержит также по меньшей мере третье перемещающее средство для удаления отделенной нуклеиновой кислоты. Предпочтительно указанный канал может быть трубкой. Указанное перемещающее средство предпочтительно может быть насосом.

Восстановление культуральной среды реализуется непрерывно обработкой для удаления ДНК из культуральной среды в ходе стадии роста и проведением обработки истощенной среды, когда во время клеточного роста начинается стадия насыщения.

Восстановление культуральной среды может быть проведено "in situ" прямо в биореакторах или фотобиореакторах с помощью обработок ферментами или другими соединениями, активными в отношении деградации ДНК, в надосадочной жидкости клеточных культур или с помощью методов, в которых применяются электрические, магнитные или электромагнитные поля. Восстановление с помощью этих методов оказалось жизнеспособным с учетом преимущества полярных характеристик молекул нуклеиновых кислот, отделяемых с помощью электрических полей или с помощью методов намагничивания молекул ДНК путем связывания с магнитными молекулами и применения магнитных полей для их отделения. В ином случае восстановление может быть проведено с помощью системы удаления, помещенной вне биореактора (фиг. 12А) или гидропонной культуры (фиг. 13А) с рециркуляцией регенерированной среды или с помощью системы удаления, интегрированной в биореактор (фиг. 12В) или гидропонную культуру (фиг. 13В).

Методы удаления ДНК из культуральной среды могут быть методами применения статических электрических полей (фиг. 14); методами применения статических магнитных полей (фиг. 15); методами применения динамических электрических и/или магнитных полей; центрифугированием; методами фильтрации; обработкой ДНКазой; термообработкой; обработкой подкислением.

В предпочтительном воплощении изобретения (фиг. 12А) указанный по меньшей мере один биореактор (1) может быть соединен с указанным по меньшей мере одним внешним блоком удаления (4) таким образом, что истощенная культуральная среда переносится в указанный по меньшей мере один блок удаления (4) с помощью по меньшей мере одного первого канала (2) и по меньшей мере одного первого

перемещающего средства. (3) для удаления культуральной среды, содержащей нуклеиновую кислоту. В таком блоке (4) восстановление может быть проведено с помощью одного из вышеупомянутых методов для удаления ДНК из среды. В этот момент отделенная нуклеиновая кислота будет собрана блоком удаления (4), предпочтительно с помощью по меньшей мере третьего канала (5) и по меньшей мере третьего перемещающего средства (6) для удаления отделенной нуклеиновой кислоты, при этом регенерированная среда будет повторно введена в указанный по меньшей мере один биореактор (1) с помощью по меньшей мере одного второго канала (7) и по меньшей мере одного второго перемещающего средства (8).

Кроме того, интеграция оборудования для фертигации в полевых условиях или защищенной культуры с системами удаления нуклеиновых кислот представляют собой другое применение настоящего изобретения. Возможная диаграмма такого применения представлена на фиг. 16, на которой резервуар с раствором, содержащим нуклеазу, интегрирован в оборудование для фертигации.

Применение случайных фрагментов тотальной ДНК для контроля или ингибирования паразитарных, заражающих и/или патогенных видов в сельском хозяйстве и медицине, по сравнению с существующими методами и продуктами, имеет значимые преимущества.

Первое преимущество является результатом абсолютной селективности обработок случайными фрагментами тотальной ДНК паразитарных, заражающих и/или патогенных видов из-за того, что указанные случайные фрагменты тотальной ДНК не оказывают воздействие на виды, отличные от подвергнутых обработке.

Применение случайных фрагментов тотальной ДНК паразитарных, заражающих и/или патогенных видов не индуцирует появление устойчивости в популяциях того же вида из-за того, что механизм действия отличается от механизма действия продуктов, представленных на рынке или исследуемых в настоящее время (включая способы РНК-интерференции и ASO), из-за множественной и одновременной интерференции с целым геномом, с целой системой транскрипции и синтеза белков, что не позволяет вырабатываться специфической устойчивости и не способствует проведению отбора устойчивой популяции.

Дополнительное преимущество является результатом отсутствия токсичности, вызванной применением нуклеиновой кислоты, поскольку, будучи первичным метаболитом, повсеместно распространенным в природе, нуклеиновая кислота не приводит к загрязнению окружающей среды. Фактически введение неспецифических фрагментов нуклеиновой кислоты не демонстрирует токсичности для видов, отличных от обработанных.

Настоящее изобретение предоставляет возможность для дальнейшего значимого упрощения исследований новых препаратов с вытекающим из этого большим экономическим эффектом. Фактически, обнаружение паразитарных, патогенных и заражающих видов представляет собой единственное условие, необходимое для получения специфического лекарственного средства для фармакологического лечения. Напротив, текущее фармакологическое исследование для продуктов, основанных на методах, таких как РНК-интерференция или применение антисмысловых олигонуклеотидов, требует не только знания полной геномной последовательности организма-мишени, но также и подробной информации о функциях генов для обнаружения возможных специфических последовательностей, которые будут использованы для ингибирования активности.

С другой стороны, традиционное фармакологическое исследование основано на исследованиях "случайного скрининга" синтетических соединений или естественных молекул. Такие вещества после обнаружения и тестирования их активности в большинстве случаев также характеризуются общей токсичностью для других организмов и людей. Из-за их токсичности практическое применение таких продуктов часто связано с загрязнением окружающей среды.

Дополнительное преимущество является результатом относительно легкой доступности и массового производства нуклеиновой кислоты, соответствующей требованиям данного патента. Фактически случайные фрагменты тотальной ДНК организма-мишени могут быть получены подходами и методами, широко распространенными в настоящее время в биомолекулярной области. Методы могут базироваться на экстракции генетического материала из организмов-мишеней или на синтезе.

Кроме того, стабильность фрагментов ДНК может обеспечить устойчивость с течением времени также в неблагоприятных условиях окружающей среды (например, в почве), что, следовательно, дает в результате при длительном применении как пользу в сфере охраны окружающей среды, так и экономическую выгоду.

Дополнительное преимущество является результатом того факта, что ДНК для предложенных применений может быть получена экстракцией природного материала или синтезом на основе методов синтеза и экстракции, а также амплификации, в настоящее время широко распространенных и разработанных в молекулярной биологии. Значимые, но не ограничивающие примеры возможных методов производства включают растворение клеточных тканей, инактивацию клеточных нуклеаз и извлечение нуклеиновых кислот из раствора, содержащего биологические лизаты.

Нуклеиновые кислоты также можно синтезировать с молекул-матриц или *de novo* различными подходами.

Рассматриваемые молекулы могут быть амплифицированы с получением, таким образом, множества копий, идентичных или похожих на рассматриваемую матрицу, например с помощью клонирования,

или методов на основе ПЦР.

Варианты ПЦР полезны для получения используемого активного вещества с помощью случайной амплификации фрагментов нуклеиновых кислот из образца-матрицы. Например, по нашему мнению, весьма подходящим является подход, подобный методу случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD), который не требует, в отличие от ПЦР, информации о целевой последовательности начальной ДНК.

Эмульсионная ПЦР представляет собой другой пример оригинального подхода, подходящего для обеспечения чрезвычайно быстрым способом амплификации различных фрагментов ДНК из образца геномной ДНК, измельченного для получения фрагментов длиной 300-800 нуклеотидов, или из ампликонов, полученных другими подходами.

Кроме того, в случае способов получения микроорганизмов в биореакторах, фотобиореакторах и емкостях для гидропонной культуры, удаление истощенной культуральной среды и ресуспендирование клеток в "регенерированной" среде, при равной клеточной концентрации на единицу объема и в тех же самых профилейных условиях, позволяет восстановить стадию роста культуры.

В дополнение к преимуществу увеличения выработки в результате удаления ингибирующего фактора, дополнительным значительным преимуществом является возможность повторного использования истощенной среды после ее регенерации, для последующих культур, возможно, нежизнеспособных в современных системах производства.

Настоящее изобретение далее будет описано, иллюстративным, но не ограничивающим способом, с конкретной ссылкой на воплощенные примеры и прилагаемые чертежи.

На фиг. 1 показано концептуальное представление задачи изобретения.

На фиг. 2 показано ингибирование прорастания семян *Lepidium* и *Acanthus* под воздействием собственной ДНК при оптимальной концентрации 200 м.д.

На фиг. 3 показано ингибирование растений *Quercus ilex*, *Quercus pubescens*, *Hedera elix*, *Ampelodesma mauritanica*, *Festuca drimeja*, *Coronilla emerus*, *Medicago marina*, *Alnus cordata*, *Robinia pseudoacacia*, *Pinus halepensis* под воздействием собственной ДНК.

На фиг. 4 показано ингибирование растений *Arabidopsis thaliana* под воздействием собственной ДНК и ДНК *Lycopersicon esculentum*.

На фиг. 5 показано ингибирующее влияние на прорастание спор и рост гиф у *Aspergillus niger*, при воздействии на указанный гриб собственной ДНК или ДНК из другого вида гриба (*Trichoderma hartianum*).

На фиг. 6 показано ингибирование насекомого *Sarcophaga carnaria* при воздействии собственной ДНК.

На фиг. 7 показаны завершенные метаморфозы в процентах по сравнению с не подвергнутым воздействию контролем, в личинках двукрылых *Sarcophaga carnaria*, подвергнутых воздействию в течение 4 недель гомологичной ДНК в трех различных концентрациях, или гетерологичной ДНК, экстрагированной из гриба (*Penicillium chrysogenum*) или бактерии (*Bacillus subtilis*).

На фиг. 8 показан подсчет жизнеспособных клеток бактерии *Bacillus subtilis* в культурах, подвергнутой в течение 24 ч воздействию гомологичной ДНК в трех различных концентрациях и в контроле, не подвергнутом воздействию.

На фиг. 9 показано прорастание спор гриба *Trichoderma harzianum* в процентах по сравнению с не подвергнутом воздействию контролем, в культурах, подвергнутых воздействию гомологичной ДНК в трех различных концентрациях, или гетерологичной ДНК, экстрагированной из другого гриба (*Aspergillus niger*), насекомого (*Sarcophaga carnaria*) или бактерии (*Bacillus subtilis*).

На фиг. 10 показана динамика роста микроводоросли *Scenedesmus obliquus* в двух культурах, подвергнутых воздействию гомологичной ДНК в различных концентрациях, и в контроле, не подвергнутом воздействию.

На фиг. 11 показано накопление внеклеточной ДНК в жидком субстрате двух различных биореакторов.

На фиг. 12 показано: (а) диаграмма системы получения микроорганизмов в биореакторе, характеризуемом внешним блоком удаления ДНК; (б) диаграмма системы получения микроорганизмов в биореакторе, где удаление ДНК из культуральной среды осуществляется блоком удаления, интегрированным в биореактор.

На фиг. 13 показано: (а) емкость для гидропонной культуры, характеризующая наличием внешнего блока для удаления ДНК и рециркуляцией культуральной среды в гидропонной системе; (б) емкость для гидропонной культуры, в которой удаление ДНК из культуральной среды происходит с помощью блока удаления, интегрированного в эту емкость.

Фиг. 14 демонстрирует специфическую диаграмму внешнего блока удаления системы, представленной на фиг. 12, где отделение нуклеиновой кислоты происходит при применении электрического поля.

Фиг. 15 демонстрирует дополнительную диаграмму блока удаления для системы, показанной на фиг. 12, где отделение нуклеиновой кислоты осуществляется при применении магнитного поля.

На фиг. 16 показана диаграмма растительной культуры, где субстрат обработан нуклеазой путем

интеграции системы фертигации.

Во всех примерах представленных экспериментов композиция нуклеиновой кислоты, использованная в различных обработках, была получена согласно процедуре, изложенной на фиг. 1. В частности, тотальная ДНК, экстрагированная с помощью стандартных процедур из органического материала (листья, мицелия грибов, микробной биомассы), была обработана ультразвуком в течение по меньшей мере трех циклов, длящихся три минуты при максимальной мощности с помощью погружного соникатора до получения композиции случайных фрагментов в диапазоне от 50 до 1000 п.о. Проверку уровня фрагментации проводили с помощью стандартных процедур с использованием агарозного или полиакриламидного гель-электрофореза и методов окрашивания, типа Sybr safe и УФ-визуализации.

Пример 1. Ингибирование растений *Acanthus mollis* и *Lepidium sativum* воздействием на них их собственной ДНК.

Первый эксперимент проводили на растениях *Acanthus mollis* и *Lepidium sativum*, последний вид был выбран из-за частичной чувствительности к токсинам. ДНК аканта *Acanthus mollis* и кресс-салата *Lepidium sativum* получали прямой экстракцией из листьев двух видов и хранили растворенными в дистиллированной H_2O . Затем 10 ранее стерилизованных семян *A. mollis* или *L. sativum*, в чашках Петри (9 см в диаметре) помещали на лист стерильной фильтровальной бумаги. Семена каждого вида обрабатывали отдельно с помощью ДНК двух видов в концентрациях 2, 20 и 200 м.д., при этом к контролю добавляли стерильную H_2O . Проращивание двух видов и общую длину корня количественно оценивали через 7 дней инкубации при 24°C путем наблюдения и измерения корней. Каждую обработку повторяли дважды.

Обработку семян двумя видами ДНК, экстрагированной из растений двух видов, применяли отдельно, что позволяло оценить влияние ДНК на рост корней и концентрацию оптимальной активности. Результаты экспериментов, представленные на фиг. 2, демонстрируют, что прорастание семян как *Lepidium*, так и *Acanthus* ингибируются при воздействии собственной ДНК при оптимальной концентрации 200 м.д. Напротив, воздействие на семена ДНК из других видов не демонстрировало значимого воздействия на прорастание семян.

Пример 2. Ингибирование растений *Quercus ilex*, *Quercus pubescens*, *Hedera elix*, *Ampelodesma mauritanica*, *Festuca drimeja*, *Coronilla emerus*, *Medicago marina*, *Alnus cordata*, *Robinia pseudoacacia*, *Pinus halepensis* под воздействием собственной ДНК.

Второй эксперимент касается анализа прорастания и роста корней 10 видов встречающихся в природе растений. Поверхность стерилизованных семян растений *Quercus ilex*, *Quercus pubescens*, *Hedera elix*, *Ampelodesma mauritanica*, *Festuca drimeja*, *Coronilla emerus*, *Medicago marina*, *Alnus cordata*, *Robinia pseudoacacia*, *Pinus halepensis*, отдельно обрабатывали ДНК всех видов, которую применяли в концентрации 500 м.д. Вкратце в чашки Петри (диаметром 9 см) помещали 10 семян каждого вида на листе стерильной фильтровальной бумага. К чашкам добавляли различные ДНК в концентрации 500 м.д., а к контролю добавляли только стерильную H_2O . Прорастание семян и общую длину корней количественно оценивали через 7 дней инкубации при 24°C путем наблюдения и измерения корней. Каждую обработку повторяли дважды. Результаты, представленные на фиг. 3 (среднее тестов, проведенных на вышеуказанных различных видах) демонстрируют ингибирование прорастания в результате воздействия собственной ДНК и отсутствие ингибирования в присутствии гетерологичной ДНК.

Пример 3. Ингибирование растений *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Lepidium sativum* и *Lens esculentum* при воздействии собственной ДНК.

Третий эксперимент касается оценки, опять с помощью тестов по прорастанию и росту корней, токсичности для различных видов растений нуклеиновой кислоты, экстрагированной из тех же видов. ДНК *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Lepidium sativum* и *Lens esculentum* получали прямой экстракцией из соответствующих растений и хранили в дистиллированной H_2O . Затем 10 ранее стерилизованных семян каждого вида помещали в чашки Петри (диаметром 10 см) на листы стерильной фильтровальной бумага. Семена каждого растения обрабатывали отдельно с помощью ДНК четырех видов в концентрациях 2, 20 и 200 м.д., а к контролю добавляли только стерильную H_2O . Эксперименты проводили в ростовых комнатах в контролируемых условиях и при полной стерильности. Прорастание четырех видов и общую радикальную длину количественно оценивали через 7 дней инкубации при 24°C путем наблюдения и измерения корней. Каждую обработку повторяли дважды. Четыре вида показали аналогичное поведение, со значимым ингибирующим эффектом в присутствии собственной ДНК и отсутствии эффектов в присутствии ДНК других видов. Как оказалось, ингибирующий эффект положительно коррелирует с концентрацией ДНК. Для примера представлена информация о *Arabidopsis thaliana* в присутствии собственной ДНК и ДНК из *Lycopersicon esculentum* соответственно. Схожие ингибирующие результаты наблюдали в случае *Arabidopsis thaliana*, когда семена этих растений подвергались воздействию тождественной ДНК, полученной амплификацией фрагментов вышеупомянутой ДНК с помощью методов ПЦР.

Пример 4. Ингибирование грибов *Aspergillus niger* и *Trichoderma harzianum* под воздействием собственной ДНК.

Четвертый эксперимент проводили на грибе *Aspergillus niger* для оценки воздействия на клеточный

рост его собственной ДНК и ДНК, выделенной из другого вида гриба, т.е. *Trichoderma harzianum*. Споры *Aspergillus niger* получали с помощью чистых культур в лаборатории на субстрате, обработанном агаром (PDA, картофельный агар с декстрозой). Споры забирали в стерильных условиях и разводили в концентрации 1×10^6 спор/мл. Эксперимент по проращиванию проводили в жидком субстрате (PDB 10%) в 96 луночных планшетах для тИФА. Сравнительную обработку проводили с помощью ДНК *Trichoderma harzianum*, используемую в качестве гетерологичной, а контроль не подвергали обработке. ДНК, экстрагированную из обоих видов, наносили в концентрациях 100 и 100 м.д. Вкратце, в каждую лунку с общим объемом 100 μ л, добавляли указанные две ДНК отдельно в различных концентрациях, вместе с 10 μ л жидкого питательного субстрата (PDB, картофельно-декстрозный бульон), стерильной воды и спорами *A. niger*. Прорастание спор и длину ростовой трубки количественно оценивали по спектрофотометрическим данным и с помощью оптического микроскопа через 20 ч инкубации при 24°C. Результаты, представленные на фиг. 5, показали значимый ингибирующий эффект на прорастание спор и рост гиф *A. niger* только тогда, когда такой гриб был подвержен воздействию собственной ДНК.

Пример 5. Ингибирование насекомого *Sarcophaga carnaria* под воздействием собственной ДНК.

Пятый эксперимент проводили на насекомом *Sarcophaga carnaria* для оценки эффекта собственной ДНК на жизненный цикл. Личинок двукрылых *Sarcophaga carnaria* выращивали в лабораторной чистой культуре при температуре 10°C и кормили мясным фаршем. Эксперимент по токсичности ДНК проводили в квадратных пластиковых чашках (размером 12×12 см, высотой 2 см). Сравнительные обработки проводили с ДНК *Bacillus subtilis* и *Lepidium sativum*, используемых в качестве гетерологичных ДНК. В качестве контроля использовали только мясной фарш без добавления других обработок. ДНК двукрылых и других двух видов добавляли к мясному фаршу в концентрациях 2, 20 и 200 м.д. при перемешивании миксером. Вкратце, в каждую чашку добавляли ДНК в различных концентрациях, перемешивали с 1 г мясного фарша. Чашки инкубировали при 10°C в темноте в течение 21 дня. Развитие, выживание и время, необходимые для образования куколок отслеживали каждые 3 дня в течение 21 дня инкубации. Личинки в контрольных условиях, а также те, которые были обработаны гетерологичной ДНК, демонстрировали обычный жизненный цикл. Напротив, воздействие собственной ДНК ингибировало жизненный цикл, вызывая смерть личинок, пропорциональную концентрации обработки. На фиг. 6 и 7 показано вышеуказанные результаты.

Пример 6. Ингибирование микроорганизма *Bacillus subtilis* под воздействием собственной ДНК.

Для демонстрации возможного применения нуклеиновой кислоты в качестве антибиотика проводили оценку токсичности на *Bacillus subtilis* обработки собственной ДНК в различных концентрациях. Эксперимент проводили с использованием ростового субстрата, 4 мл LB (Luria Broth), инокулированного 10 мкл предварительной культуры *Bacillus subtilis*. Обработка заключалась в приготовлении культур в присутствии ДНК *Bacillus subtilis* в конечных концентрациях 4, 40 и 400 м.д. Культуры инкубировали при перемешивании при 35°C в течение 24 ч с тремя повторными обработками. Через 24 ч инкубации, из каждой тестовой пробирки забирали по 0,5 мл и серийно разводили в среде LB, из которых 100 мкл среды LB, обработанной агаром, помещали в чашки Петри. Чашки инкубировали при 28°C до появления колоний (КОЕ - колониеобразующие единицы). Результаты, представленные на фиг. 8, демонстрируют значимое зависимое от концентрации снижение КОЕ в ответ на обработку.

Пример 7. Ингибирование гриба *Trichoderma harzianum* под воздействием собственной ДНК.

Для демонстрации возможного применения нуклеиновых кислот в качестве фунгицида и специфичности действия провели эксперимент на прорастание спор гриба *Trichoderma harzianum*. Споры *Trichoderma harzianum* получали с помощью чистых лабораторных культур на субстрате, обработанном агаром (PDA, картофельный агар с декстрозой). Споры забирали в стерильных условиях и разводили в концентрации 1×10^6 спор/мл. Эксперимент по проращиванию проводили в жидком субстрате (PDB 10%) в 96-луночных планшетах для тИФА. Обработку проводили с гомологичной или гетерологичной ДНК, которую экстрагировали из того же вида *Trichoderma* или из другого вида гриба (*Aspergillus niger*), из насекомого (*Sarcophaga carnaria*) или из бактерии (*Bacillus subtilis*). ДНК, экстрагированную из различных видов, наносили в концентрациях 8, 80 и 800 м.д. Вкратце, в каждую лунку, с общим объемом 100 μ л, добавляли ДНК отдельно в различных концентрациях, вместе с 10 μ л жидкого питательного субстрата (PDB, картофельно-декстрозный бульон), стерильной воды и спорами *Trichoderma*. Прорастание спор и длину ростовой трубки количественно оценивали по спектрофотометрическим данным и с помощью оптического микроскопа через 20 ч инкубации при 24°C.

На фиг. 9 показаны результаты эксперимента, демонстрирующие значимое зависимое от концентрации ингибирующее воздействие на прорастание спор *Trichoderma* только ДНК этого же вида гриба. Напротив, обработка ДНК различных видов демонстрирует стимулирующее влияние на прорастание (процент значений по сравнению с контролем, не подвергнутому воздействию, выше чем 100%).

Пример 8. Ингибирование микроводоросли *Scenedesmus obliquus* под воздействием собственной ДНК.

Для демонстрации возможного применения ДНК в качестве альгицида проводили тест роста зеле-

ных водорослей *Scenedesmus obliquus* в оптимальных контрольных условиях и в присутствии собственной ДНК в культуральном субстрате (CHU#10). Обработки проводили двумя различными концентрациями (50 и 500 м.д.) с двумя повторами. Фиг. 10 демонстрирует динамику роста водорослей и демонстрирует значимый зависимый от концентрации ингибирующий эффект гомологичной ДНК по сравнению с контролем, не подвергнутым воздействию.

ПРИМЕР 9. Ингибирование простейшего *Physarium polycephalum* под воздействием собственной ДНК.

Для демонстрации возможного применения ДНК в качестве антипротозойного продукта провели эксперимент на простейшем *Physarium polycephalum*. В качестве экспериментального материала использовали культуральный набор, производимый "Carolina Biological Supply". Культуры начинали на чашках Петри с водой-агаром, способствующими движению организмов. В качестве питательного вещества использовали овсяные хлопья. Первую производственную культуру растили на 20 чашках и через 15 дней полученную биомассу простейших собирали и использовали для экстракции ДНК с использованием набора "Qiagen". Последующий эксперимент состоял из получения трех чашек Петри, заполненных водой-агаром, к которым добавляли две малые части овсяных хлопьев, одну для контроля с 5 мл дистиллированной воды и другую с добавлением 5 мл воды с ДНК простейшего в концентрации 200 м.д. Эксперимент повторяли два раза с вариацией, заключавшейся в том, что ДНК была из бактерии (*Bacillus subtilis*) и насекомого (*Sarcophaga carnaria*). Результаты экспериментов демонстрируют отсутствие роста *Physarium polycephalum* на субстрате, обработанном ДНК этого же простейшего, при этом организм не показал различий роста в контрольных условиях или в присутствии гетерологичной ДНК.

Пример 10. Исследование производственного процесса дрожжей, бактерий и водорослей в биореакторах и фотобиореакторах.

С учетом вышеупомянутых демонстраций ингибирующего эффекта на различных видах под воздействием собственной ДНК проводили проверочные анализы в присутствии внеклеточной ДНК в ростовом субстрате в биореакторах и фотобиореакторах с клеточными культурами при высокой плотности, когда происходит замедление роста, даже при наличии оптимального питательного субстрата. Исследование включало сбор образцов жидкой надосадочной жидкости различных культур в биореакторах в стадиях экспоненциального роста, замедления и стабилизации. В анализ были включены культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, бактерий *Bacillus subtilis*, микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Scenedesmus obliquus*. Образцы супернатантов клеточных культур, полученных двумя циклами центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин, анализировали для отделения возможных клеточных остатков и подвергали гель-электрофорезу после обработки Syber-Safe и оценки флуоресценции. На фиг. 11 показаны результаты некоторых из этих анализов, из которых очевидно накопление внеклеточной ДНК в жидком субстрате биореакторов. Это накопление четко связано с замедлением роста различных клеточных культур) и с переходом к стадии стабилизации (фиг. 11А и В). На фиг. 11С ясно показано, как удаление внеклеточной ДНК из культуральной среды с помощью химико-физических процедур и последующее введение регенерированного субстрата в реактор приводит к устранению ингибирующего эффекта и последующему восстановлению роста клеточной культуры.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования организмов биологического вида, включающий воздействие на указанные организмы композицией, содержащей ДНК, полученную случайной фрагментацией экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, где указанная тотальная ДНК принадлежит указанному виду или виду, филогенетически сходному с указанным видом, где филогенетически сходный вид представляет собой вид, ДНК которого, полученная путем случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или путем синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, ингибирует указанный вид, и где указанное воздействие включает инъекцию, проглатывание, ингаляцию или адсорбцию ДНК указанными организмами.

2. Способ по п.1, где указанный вид выбран из патогенных, паразитических или инфицирующих видов.

3. Способ по п.1, где указанная композиция является биоцидной.

4. Способ по п.1, где указанная композиция выбрана из гербицидной, фунгицидной, инсектицидной, акарицидной, нематоцидной, антипротозойной, альгицидной или бактерицидной композиции.

5. Способ по любому из пп.1-4, который дополнительно включает воздействие на организмы биологического вида пестицидными соединениями, выбранными из группы, состоящей из фунгицидов, инсектицидов, нематоцидов, майтицидов, артропоцидов, бактерицидов и альгицидов.

6. Композиция, выбранная из противопатогенной, противопаразитической или противои инфицирующей композиции, где указанная композиция содержит активный ингредиент против паразитических, патогенных или заражающих организмов биологического вида, отличающаяся тем, что указанным активным ингредиентом является ДНК, полученная случайной фрагментацией экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, где указанная тотальная ДНК

происходит из указанного вида или из филогенетически сходного вида, где филогенетически сходный вид представляет собой вид, ДНК которого, полученная путем случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или путем синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, является ингибирующей для указанного вида.

7. Композиция по п.6, где указанная композиция дополнительно содержит пестицидное соединение, выбранное из группы, состоящей из фунгицидов, инсектицидов, нематоцидов, майтицидов, артропозидов, бактерицидов и альгицидов.

8. Композиция, содержащая ДНК, полученную случайной фрагментацией экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, для терапевтического воздействия против патогенного, паразитического или инфицирующего вида, где указанная тотальная ДНК принадлежит указанному патогенному, паразитическому или инфицирующему виду или филогенетически схожему виду, где филогенетически сходный вид представляет собой вид, ДНК которого, полученная путем случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или путем синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, является ингибирующей для указанного вида.

9. Композиция по п.8, где указанная композиция дополнительно содержит пестицидные соединения, выбранные из группы, состоящей из фунгицидов, инсектицидов, нематоцидов, майтицидов, артропозидов, бактерицидов и альгицидов.

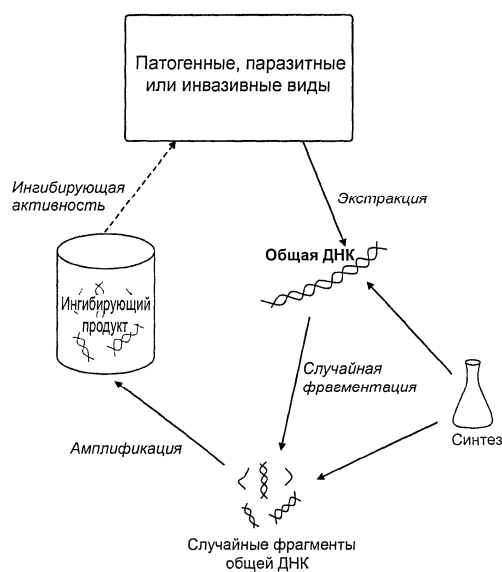
10. Применение ДНК биологического вида, полученной случайной фрагментацией экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, для ингибирования организмов указанного вида или вида, филогенетически сходного с указанным видом, где указанные организмы являются организмами, подлежащими ингибированию, и где филогенетически сходный вид представляет собой вид, ДНК которого, полученная путем случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или путем синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, является ингибирующей для указанного вида.

11. Применение по п.10, где указанная ДНК используется в качестве противопатогенного, противопаразитического или противои инфицирующего агента.

12. Применение по п.10, где ДНК используется в качестве биоцида.

13. Применение по п.10, где ДНК используется в качестве гербицида, фунгицида, инсектицида, акарицида, нематоцида, антипротозойного агента, альгицида или бактерицида в зависимости от вида.

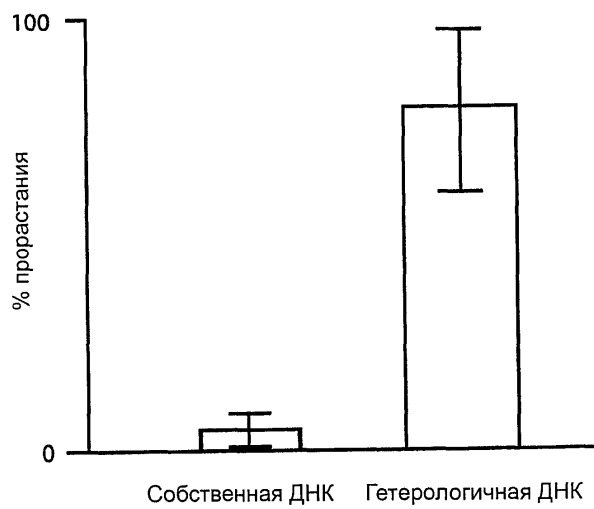
14. Применение ДНК биологического вида, полученной случайной фрагментацией экстрагированной тотальной ДНК или посредством синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК для ингибирования организмов указанного вида или вида, филогенетически сходного с указанным видом, где указанные организмы являются организмами, подлежащими ингибированию, и где филогенетически сходный вид представляет собой вид, ДНК которого, полученная путем случайной фрагментации экстрагированной тотальной ДНК или путем синтеза случайных фрагментов с тотальной ДНК, является ингибирующей для указанного вида, где указанное применение представляет собой комбинированное применение с дополнительным пестицидным соединением, выбранным из группы, состоящей из фунгицидов, инсектицидов, нематоцидов, майтицидов, артропозидов, бактерицидов и альгицидов.



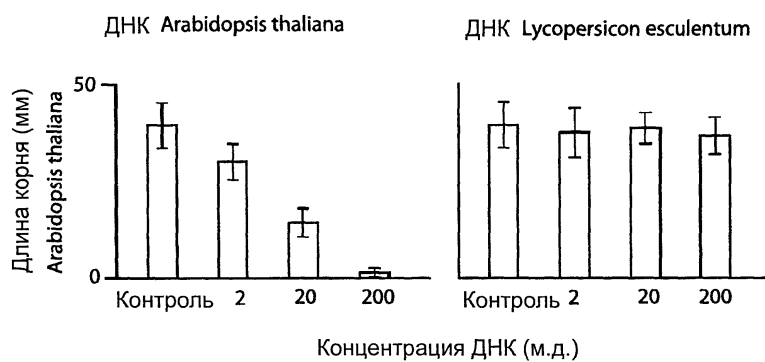
Фиг. 1

Обработка	Вид	
	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Acanthus mollis</i>
Контроль, вода		
ДНК <i>Lepidium</i> (200 м.д.)		
ДНК <i>Acanthus</i> (200 м.д.)		

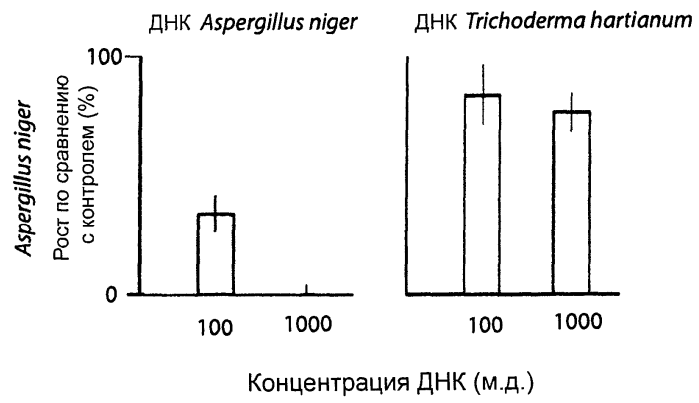
Фиг. 2



Фиг. 3

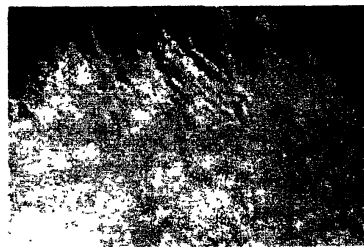


Фиг. 4



Aspergillus niger

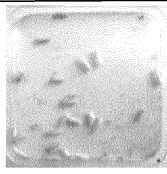
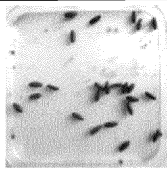
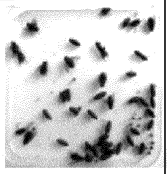

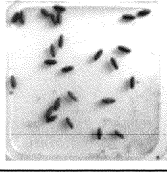
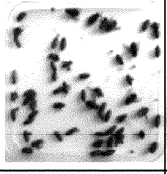
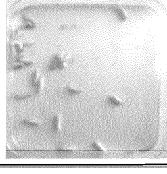
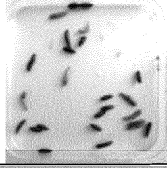


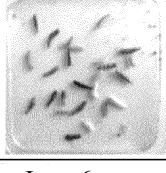
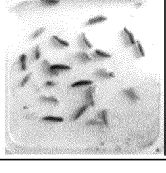
Контроль



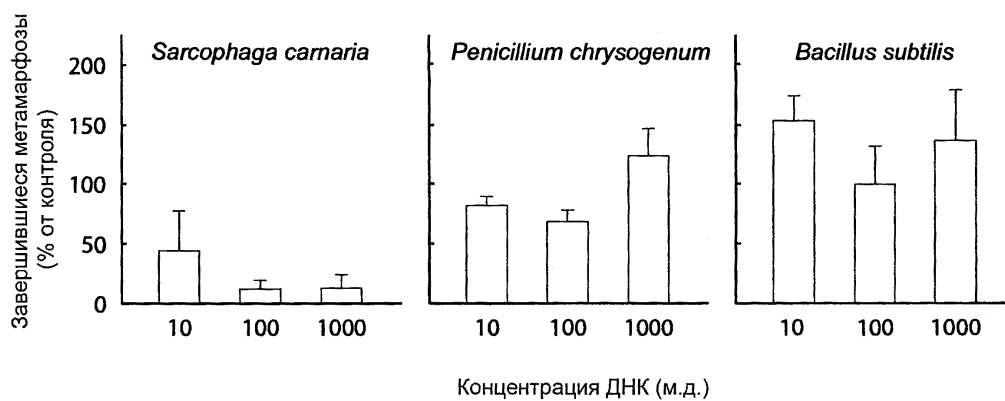
ДНК *Aspergillus*
(1000 м.д.)



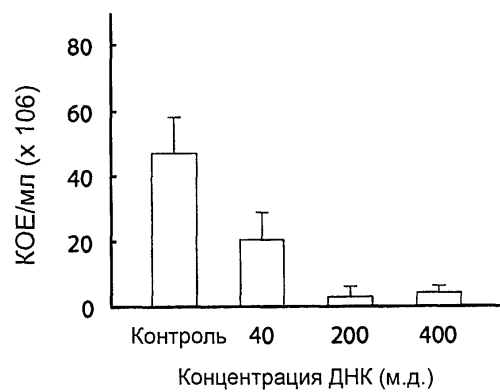
Фиг. 5

	$t = 0$	$t = 10$ дней	$t = 20$ дней	Количество живых мух
Контроль				25
Гетерологичная ДНК (200 м.д.)				24
Собственная ДНК (20 м.д.)				2
Собственная ДНК (20 м.д.)				0

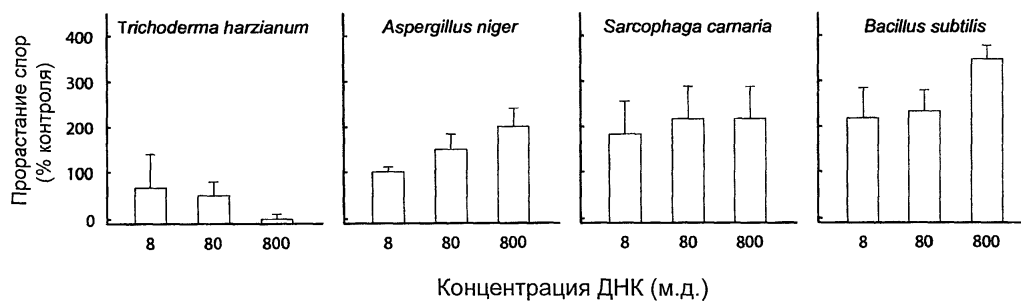
Фиг. 6



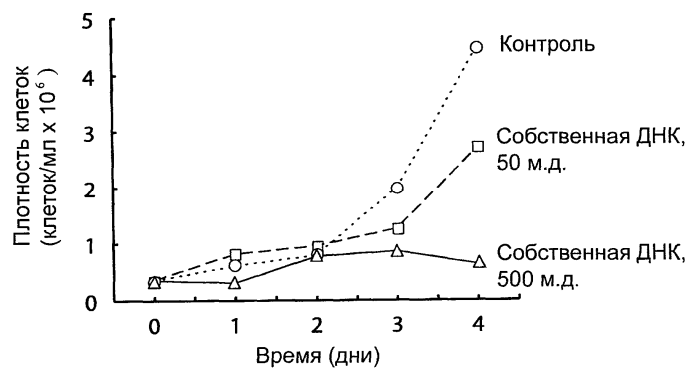
Фиг. 7



Фиг. 8

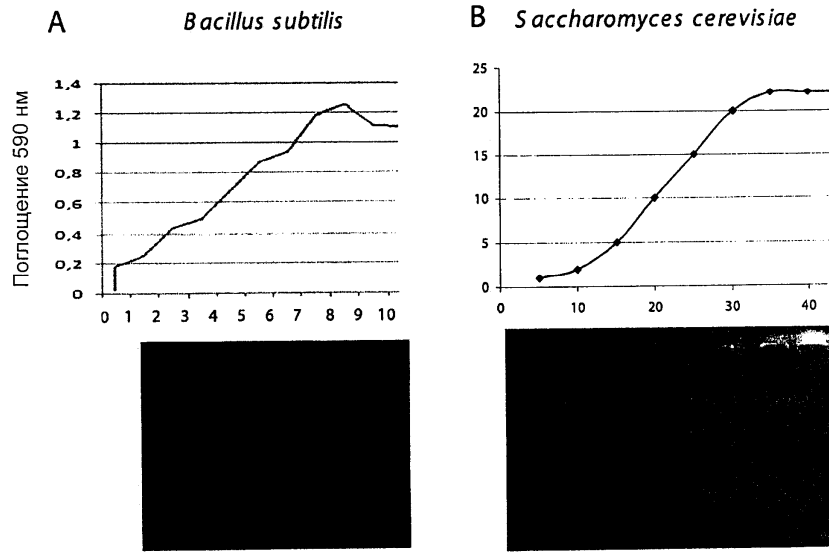


Фиг. 9

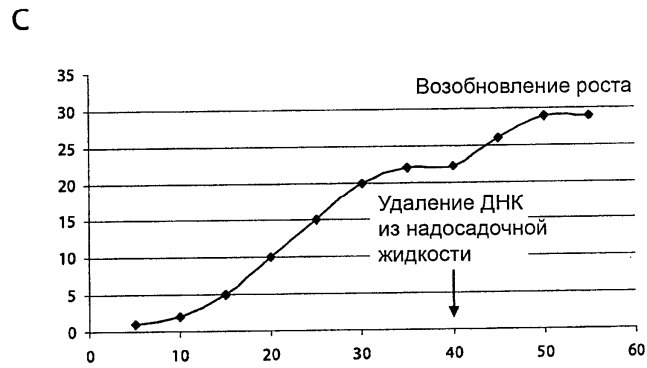


Фиг. 10

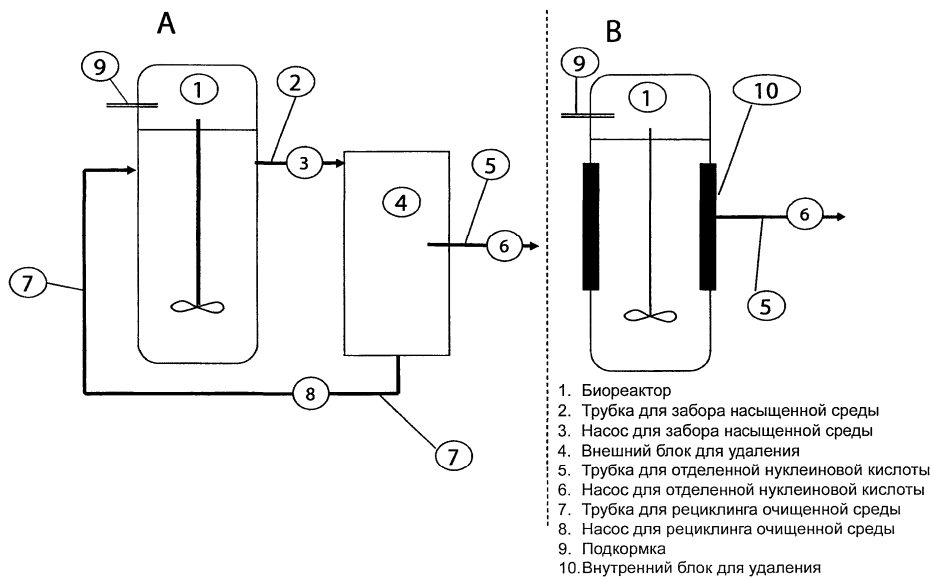
Экспериментальные доказательства накопления ДНК в супернатанте биореактора и связанный с этим ингибирующий эффект на рост



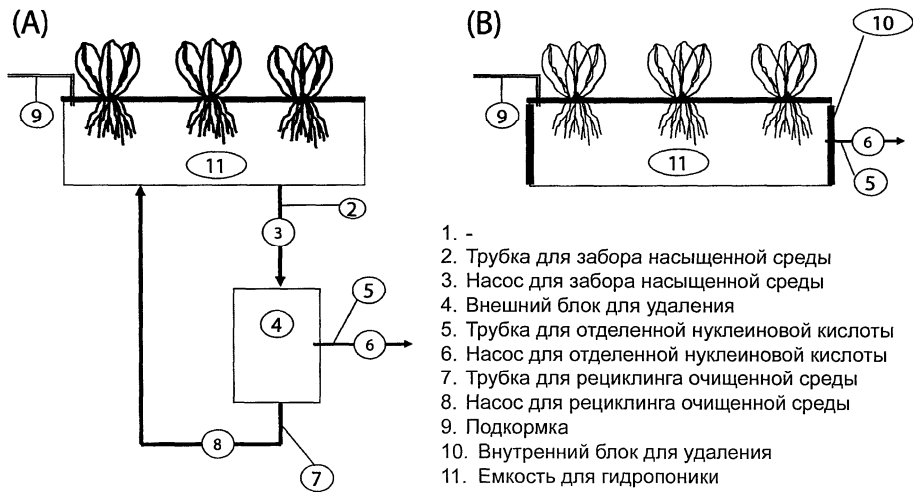
Флуоресценция супернатанта из микробных культур на 1% агарозном геле + SYBR safe



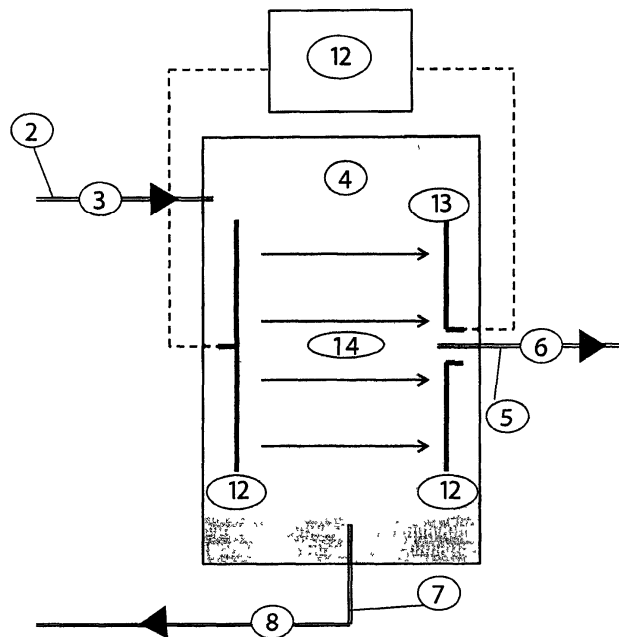
Фиг. 11



Фиг. 12

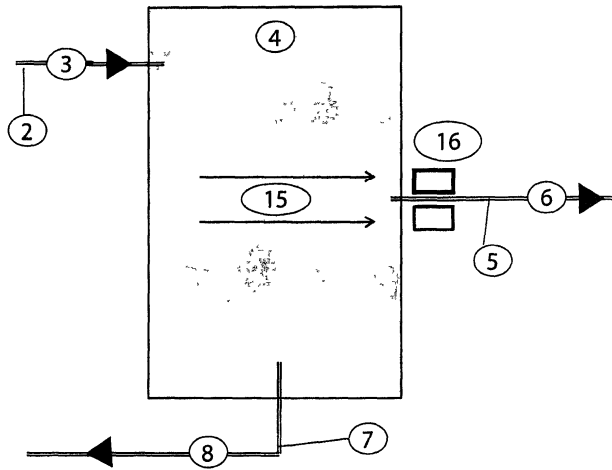


Фиг. 13



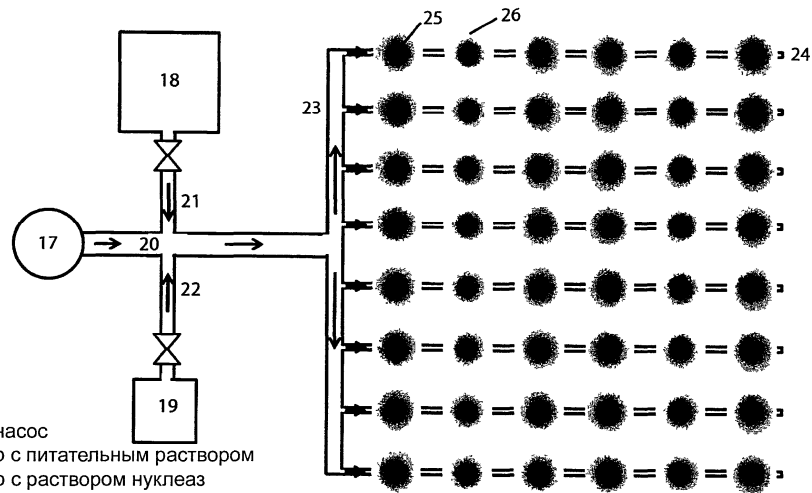
1. -
2. Трубка для забора насыщенной среды
3. Насос для забора насыщенной среды
4. Внешний блок для удаления
5. Трубка для отделенной нуклеиновой кислоты
6. Насос для отделенной нуклеиновой кислоты
7. Трубка для рециклинга очищенной среды
8. Насос для рециклинга очищенной среды
9. -
10. -
11. -
12. Электронный контроль поля
13. Металлические пластины
14. Электрическое поле

Фиг. 14



1. -
2. Трубка для забора насыщенной среды
3. Насос для забора насыщенной среды
4. Внешний блок для удаления
5. Трубка для отделенной нуклеиновой кислоты
6. Насос для отделенной нуклеиновой кислоты
7. Трубка для рециклинга очищенной среды
8. Насос для рециклинга очищенной среды
9. -
10. -
11. -
12. -
13. -
14. -
15. Магнитное поле
16. Постоянный магнит/электромагнит

Фиг. 15



17. Водяной насос
18. Резервуар с питательным раствором
19. Резервуар с раствором нуклеаз
20. Основная проточная трубка
21. Канал для закачки питательного раствора
22. Канал для закачки нуклеазы
23. Головная трубка
24. Секции или каналы для капельного внесения
25. Капельные водовыпуски или разбрызкиватели
26. Область ирригации

Фиг. 16

