

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393236 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.20(51) Int. Cl. A01N 63/50 (2020.01)
C07K 14/47 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.06.16

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

(31) 63/202,559; 63/365,928

(72) Изобретатель:

(32) 2021.06.16; 2022.06.06

Шах Дилип М., Тетория Минакши
(US)

(33) US

(86) PCT/US2022/072971

(74) Представитель:

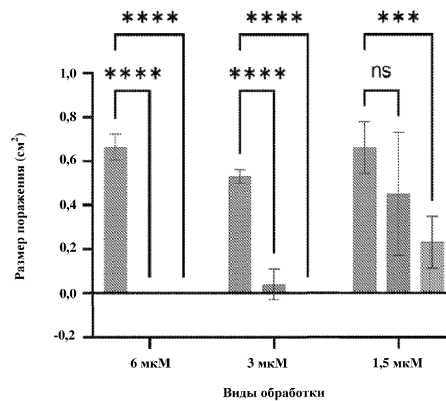
(87) WO 2022/266648 2022.12.22

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ДОНАЛД ДЭНФОРТ ПЛЭНТ
САЙЕНС СЕНТЕР (US)

(57) Раскрыты противомикробные варианты пептида дефензина, содержащие модифицированные С-концевые фрагменты дефензина, и нуклеиновые кислоты, кодирующие их. Также раскрыты композиции, содержащие варианты пептида дефензина и способы их применения для контроля микробных инфекций растений и субъектов-позвоночных, а также загрязнения пищевых продуктов и кормовых продуктов.



■ B. cinerea
■ GMA4C_V9 (SEQ ID NO: 581)
■ GMA4C_V10 (SEQ ID NO: 582)

A1

202393236

202393236

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580112EA/042

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США с порядковым № 63/365928, поданной 6 июня 2022 года, и заявки на патент США с порядковым № 63/202559, поданной 16 июня 2021 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПРАВИТЕЛЬСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКЕ

[2] Настоящее изобретение было выполнено при правительственной поддержке в рамках гранта Национального научного фонда EAGER номер 1955461, присужденного Национальным научным фондом. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[3] Перечень последовательностей, содержащийся в файле под названием "P13511WO00_ST25", размером 294870 байт, как измерено в операционной системе Windows, и который был создан 15 июня 2022 года и в электронном виде подан с данным документом, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Защита сельскохозяйственно ценных культур от патогенных микроорганизмов (например, грибов или оомицетов) имеет решающее значение для повышения урожайности культур. Микробные инфекции являются особой проблемой во влажном климате и могут стать серьезной проблемой во время хранения урожая, когда такие инфекции могут привести к порче и загрязнению пищевых или кормовых продуктов микробными токсинами. К сожалению, современные способы выращивания, сбор и системы хранения могут способствовать заражению патогенами растений.

[5] Контроль патогенов растений дополнительно осложнен необходимостью одновременного контроля нескольких микроорганизмов, принадлежащих к разным родам. Например, такие микроорганизмы, как виды *Alternaria*; *Ascochyta*; *Aphenomyces*; *Botrytis*; *Cercospora*; *Colletotrichum*; *Diplodia*; *Erysiphe*; *Fusarium*; *Gaeumanomyces*; *Helminthosporium*; *Leptosphaeria*, *Macrophomina*; *Magnaporthe*; *Nectria*; *Peronospora*; *Phoma*; *Phakopsora*, *Phymatotrichum*; *Phytophthora*; *Plasmopara*; *Podosphaera*; *Puccinia*; *Pythium*; *Pyrenophora*; *Pyricularia*; *Rhizoctonia*; *Sclerotium*; *Sclerotinia*; *Septoria*; *Thielaviopsis*; *Uncinula*; *Venturia*; и *Verticillium* являются общепризнанными патогенами растений.

[6] Некоторые микроорганизмы (например, грибы, включая плесневые, дрожжевые и диморфные грибы или оомицеты) также могут быть патогенными для различных позвоночных, включая людей, домашний скот, животных-компаньонов, рыб и т. п. Микроорганизмы, включая дерматофитов, виды *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Coccidiomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Saksenaea*,

Rhizomucor, *Syncephalostrum*, *Cokeromyces*, *Actinomucor*, *Pythium*, *Fusarium*, *Histoplasmosis*, или *Blastomyces*, также являются важными патогенами позвоночных.

[7] Было показано, что группа белков, известных как дефензины, подавляет патогены растений. Дефензины были идентифицированы ранее как малые богатые цистеином пептиды из приблизительно 45-54 аминокислот, которые составляют важный компонент врожденного иммунитета растений (Thomma et al., 2002; Lay and Anderson, 2005; Vriens et al., 2014). Широко распространенные в растениях дефензины сильно различаются по своему аминокислотному составу. Однако все они имеют компактную форму, которая стабилизируется четырьмя или пятью внутримолекулярными дисульфидными связями. Растительные дефензины ранее были охарактеризованы как содержащие консервативный гамма-коровый пептид, содержащий консервативную последовательность GXCX₃-9C (где X представляет собой любую аминокислоту) (Sagaram et al., 2011; Lacerda et al., 2014). Трехмерная структура ранее охарактеризованного гамма-корового пептида состоит из двух антипараллельных β-листов с вставочной областью изгиба (*там же*). Противомикробная активность определенных дефензинов была соотнесена с наличием положительно заряженных аминокислотных остатков в гамма-коровом пептиде (Spelbrink et al, Plant Physiol., 2004; Sagaram et al, 2013).

[8] Растительные дефензины были активно изучены в рамках их роли в защите растений. Некоторые растительные дефензины подавляют рост широкого спектра микроорганизмов в микромолярных концентрациях (Broekaert et al, 1995; Broekaert et al, 1997; da Silva Conceicao and Broekaert, 1999) и, будучи экспрессированными в трансгенных растениях, придают им сильную устойчивость к патогенам-микроорганизмам (da Silva Conceicao and Broekaert, 1999; Thomma et al., 2002; Lay and Anderson, 2005). Два малых богатых цистеином белка, выделенные из семян редиса, Rs-AFP1 и Rs-AFP2, подавляли рост многих патогенных микроорганизмов, когда чистый белок добавляли в среду для противомикробного анализа *in vitro* (патент США № 5538525). Трансгенные растения табака, содержащие ген, кодирующий белок Rs-AFP2, оказались более устойчивыми к атакам микроорганизмов, чем нетрансформированные растения.

[9] Гены дефензина также были идентифицированы у бобового растения *Medicago truncatula* (Hanks et al., 2005). Клонированный белок MtDef2, как было продемонстрировано в экспериментах *in vitro*, не характеризуется или характеризуется незначительной противомикробной активностью (Spelbrink et al., 2004). Белки дефензина *Medicago truncatula* MtDef4 (патент США № 7825297, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и MtDef5 (WO2014179260 и заявка на патент США № 20160208278, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) характеризуются противомикробной активностью. С-концевой 16-аминокислотный пептид GMA4-C из белка дефензина MtDef4 подавлял *Fusarium graminearum* при концентрациях всего лишь 3 мкМ (Sagaram et al., 2011)

[10] Растительные дефензины с сильной противогрибковой активностью *in vitro*,

зачастую не обеспечивают эффективную устойчивость к заболеваниям *in planta*. Это сдерживает их коммерческую разработку в качестве противогрибковых средств у трансгенных культур. Противогрибковые растительные дефензины обычно являются катионными, и считается, что катионные остатки в их последовательностях инициируют прохождение через клеточную оболочку грибов за счет электростатических взаимодействий с анионной клеточной мембраной грибов (Kerenga et al., 2019). Калий (K⁺) является незаменимым макроэлементом и также самым распространенным катионом в растениях. Концентрация K⁺ в цитоплазме растительной клетки постоянно составляет от 100 до 200 мМ (Shabala and Pottosin, 2010) и от 10 до 200 мМ в апопласте (White and Karley, 2010). Кальций является незаменимым вторичным микроэлементом, и его концентрации могут находиться в диапазоне от 0,1 до 6% от сухого веса растений (Broadley et al., 2003). Концентрации натрия (Na⁺) в растениях находятся в диапазоне от 0,001% до 8% (Marschner, 1995). Na⁺ является незаменимым микроэлементом для растений на засоленных почвах.

[11] Многие растительные дефензины, которые были охарактеризованы на сегодняшний день, теряют свою противогрибковую активность при повышенных концентрациях одно- и двухвалентных катионов, таких как 100 мМ KCl или 2 мМ CaCl₂. Однако дефензин ZmD32 растений маиса с расчетным зарядом +10,1 при pH 7 проявляет ингибирующую активность против *Candida* sp. и *E. coli* в присутствии 100 мМ NaCl, в то время как дефензин NbD6 из растения *Nicotiana benthamiana* с расчетным зарядом +7,6 при pH 7 проявляет подавляющую активность против *Candida albicans* в присутствии 100 мМ NaCl (Kerenga et al., 2019).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[12] Представлен пептид, содержащий последовательность XGXCXGFXXXX(F/W/Y)XXXXC (SEQ ID NO: 1), где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41; где необязательно указанный пептид содержит модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y), изложенную под SEQ ID NO: 33, GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y), изложенную под SEQ ID NO: 34, GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43) или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44); и/или где необязательно С-концевой цистеиновый остаток или С-концевой аминокислотный остаток амидирован. Представлен пептид, характеризующийся по меньшей мере 75%, 82% или 94% идентичностью последовательности по всей длине любой из SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6, где пептид не является идентичным SEQ ID NO: 8, где необязательно любая аминокислотная замена в указанной последовательности увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд при нейтральном pH и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида, и где необязательно С-концевой цистеиновый остаток амидирован. Представлен пептид, характеризующийся по меньшей мере 75%, 82% или 94% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 7, 12, 13, 14, 15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29,

31 и 32, где пептид не является идентичным SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41, где необязательно пептид с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 31 или 32 содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками, и где необязательно любая замена увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд при нейтральном pH и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида, и где необязательно С-концевой цистеиновый остаток или С-концевой аминокислотный остаток амидирован. Представлен вариант С-концевого пептида дефензина, содержащий консервативные цистеиновые остатки С1 и С4, соответствующие N-концевому и С-концевому цистеинам эталонного С-концевого пептида дефензина, где консервативные цистеиновые остатки С2 и С3 эталонного С-концевого пептида дефензина независимо замещены триптофаном, тирозином, фенилаланином, лейцином, валином, изолейцином или метионином; и где необязательно вариант пептида дефензина характеризуется суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере 3, 3,5, 4, 5 или 6, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%. Представлен вариант С-концевого пептида дефензина, содержащий модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность под GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52). В определенных вариантах осуществления упомянутый выше пептид проявляет противомикробную активность, где противомикробная активность необязательно представляет собой одну или несколько из противогрибковой или антибактериальной активности. Также представлены композиции, содержащие любой из упомянутых выше пептидов и приемлемые в сельскохозяйственной, фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Также представлены композиции, содержащие любые из упомянутых выше пептидов и носителей, разбавителей или вспомогательных веществ, для применения в лечении, предупреждении или подавлении микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом.

[13] Также представлены способы: (i) предупреждения или уменьшения повреждения урожая патогенным для растений микроорганизмом или (ii) предупреждения загрязнения растений, частей растений, семян, полученных из них кормов или полученных из них пищевых продуктов, нежелательным микроорганизмом, включающие

стадию приведения растения, семени растения или другой части указанного растения в контакт с эффективным количеством любой из упомянутых выше композиций, где композиция необязательно содержит приемлемые для сельского хозяйства носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

[14] Также представлены части растений, включая семена, которые по меньшей мере частично покрыты любой из упомянутых выше композиций, где композиция необязательно содержит приемлемые для сельского хозяйства носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

[15] Также представлены медицинские устройства, содержащие устройство и упомянутую выше композицию, где устройство содержит по меньшей мере одну поверхность, которая сверху покрыта и/или пропитана композицией, где композиция необязательно содержит приемлемые в фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

[16] Также представлены способы лечения, предупреждения или подавления микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту эффективного количества любой из упомянутых выше композиций, где композиция необязательно содержит приемлемые в фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Представлено применение любой из упомянутых выше композиций в способе лечения, предупреждения или подавления заражения микроорганизмами или дрожжами у субъекта, нуждающегося в этом. Также представлено применение любого из упомянутых выше первого противомикробного пептида или белков в изготовлении лекарственного препарата или композиции для подавления заражения микроорганизмами или дрожжами у субъекта, нуждающегося в этом.

[17] Представлены рекомбинантные полинуклеотиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий пептиды, содержащие любой из упомянутых выше пептидов, где полинуклеотид, кодирующий противомикробный пептид, функционально связан с полинуклеотидом, содержащим промотор, который является гетерологичным по отношению к полинуклеотиду, кодирующему первый противомикробный пептид, где необязательно любая аминокислотная замена в указанной последовательности увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд и/или гидрофобность пептида.

[18] Представлены ядерные или пластидные геномы растений, содержащие полинуклеотид, кодирующий противомикробный пептид, содержащие любой из упомянутых выше пептидов, где полинуклеотид является гетерологичным по отношению к ядерному или пластидному геному, и где полинуклеотид функционально связан с эндогенным промотором ядерного или пластидного генома.

[19] Представлены клетки, растение и части растения, в том числе семена, содержащие упомянутые выше рекомбинантные полинуклеотиды или геномы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[20] На **фиг. 1А и 1В** показаны анализы капельной инокуляции на листьях *Nicotiana benthamiana*. Использовали четырехнедельные листья *N. benthamiana* для анализов капельной инокуляции противodeйствия *B. cinerea* с разной концентрацией пептидов GMA4C. **1А.** Графическое представление анализов капельной инокуляции и фотографии, сделанные после 48 ч инкубации при белом свете и с помощью CropReporter. Поврежденные участки представлены красным цветом на изображениях CropReporter. Данные для контроля GMA4C_АC дикого типа (SEQ ID NO: 2) находятся на самой левой панели (обозначена как "GMA4C"), данные для GMA4c_V1A (SEQ ID NO:3) находятся на 2^{ой} панели слева, данные для GMA4c_V2A (SEQ ID NO:4) находятся на 3-ей панели слева, а данные для GMA4c_V3A (SEQ ID NO:5) находятся на 4-ой панели **слева**. **1В.** Поражения измеряли через 48 ч с использованием программного обеспечения ImageJ, а их размеры показаны на графике.

[21] На **фиг. 2** показано выравнивание неограниченной подгруппы эталонных С-концевых пептидов дефензина, которые включают консервативные цистеины C1, C2, C3 и C4 (выделены жирным шрифтом). Консервативный гамма-коровый пептид подчеркнут.

[22] На **фиг. 3** показано выравнивание неограниченной подгруппы эталонных С-концевых пептидов дефензина, которые включают консервативные цистеины C1, C2, C3 и C4 (выделены жирным шрифтом), гамма-коровую консенсусную последовательность и различные модифицированные гамма-коровые консенсусные последовательности, представленные в данном документе. Консервативный гамма-коровый пептид подчеркнут и отсутствует в модифицированных гамма-коровых консенсусных пептидах.

[23] На **фиг. 4** представлена таблица данных противомикробной активности различных вариантов пептидов дефензина GMA4C.

[24] **Фиг. 5А, В.** На **фиг. 5А, В** показаны результаты анализа капельной инокуляции, демонстрирующие противогрибковую активность пептидов GMA4C_V9 (SEQ ID NO: 581) и GMA4C_V10 (SEQ ID NO: 582). GMA4C_V10 полностью устраняет симптомы серой гнили при 6 мкМ. На **фиг. 5В** крайние левые столбики относятся к контролю без обработки ("*B. cinerea*"), средние столбики относятся к обработке GMA4C_V9 (SEQ ID NO: 581), а крайние правые столбики относятся к обработке GMA4C_V10 (SEQ ID NO: 582). При 3 мкМ и 1,5 мкМ GMA4C_V10 более эффективен в снижении симптомов серой гнили, чем GMA4C_V9.

[25] На **фиг. 6А, В** показаны результаты анализа капельной инокуляции, демонстрирующие противогрибковую активность GMAOe1C_WT (SEQ ID NO: 577), GMAOe1C_V3 (SEQ ID NO: 578) и GMAOe1C_V4 (SEQ ID NO: 579). На **фиг. 6В** крайние левые столбики относятся к контролю без обработки ("*B. cinerea*"), 2^{bc} слева столбики относятся к обработке GMAOe1C_WT, 3^{bn} слева столбики относятся к обработке GMAOe1C_V3, а 4^{bc} слева столбики относятся к обработке GMAOe1C_V4. GMAOe1C_V3 и GMAOe1C_V4 при 3 мкМ и 6 мкМ полностью устраняли симптомы серой гнили, но GMAOe1C_WT эффективен только при 6 мкМ. При концентрации, составляющей 1,5 мкМ, GMAOe1C_V3 более эффективен, чем GMAOe1C_V4 или GMAOe1C_WT.

[26] На фиг. 7А, В показаны результаты анализа капельной инокуляции, демонстрирующие противогрибковую активность GMA1C_V1 (SEQ ID NO: 583) и GMA1C_V2 (SEQ ID NO: 584) при противодействии *B. cinerea*. На фиг. 7В крайние левые столбики относятся к контролю без обработки ("*B. cinerea*"), средние столбики относятся к обработке GMA1C_V1 (SEQ ID NO: 583), а крайние правые столбики относятся к обработке GMA1C_V2 (SEQ ID NO: 584).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[27] Определения

[28] Используемый в данном документе термин "и/или" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А и/или В", в данном документе включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогичным образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", включает каждый из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[29] Используемые в данном документе термины "соответствует", "соответствующий" и т. п. при использовании в контексте аминокислотного положения, мутации и/или замены в любом данном пептиде (например, варианте пептида дефензина) по отношению к последовательности эталонного пептида (например, последовательности эталонного С-концевого пептида дефензина, включая SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89-122), все относятся к аминокислотному остатку в данной пептидной последовательности, который имеет то же местоположение в данном пептиде, что и остаток в эталонной аминокислотной последовательности, когда данный пептид выравнивают с эталонной последовательностью. В определенных вариантах осуществления выравнивание представляет собой выравнивание 4 консервативных цистеиновых остатков С-концевого пептида дефензина из варианта пептида дефензина и последовательности эталонного С-концевого пептида дефензина (например, как показано на фиг. 2 и 3).

[30] Используемые в данном документе термины "включать", "включает" и "включающий" следует понимать как по меньшей мере характеризующийся признаками, на которые они ссылаются, не исключая при этом никаких дополнительных не указанных признаков.

[31] Если термин представлен в единственном числе, также представлены другие варианты осуществления, описанные множественным числом этого термина.

[32] Используемая в данном документе фраза "противомикробный пептид" относится к пептидам, которые проявляют любую одну или несколько из следующих характеристик: подавление роста клеток микроорганизмов, уничтожение клеток микроорганизмов, нарушение или замедление таких стадий жизненного цикла микроорганизмов, как прорастание спор, споруляция или конъюгация, и/или нарушение

заражения, проникновения или распространения клеток микроорганизмов в пределах растения или другого восприимчивого субъекта, включая человека, домашний скот, домашнюю птицу, рыбу или животного-компаньона (например, собаку или кошку).

[33] Используемые в данном документе термины “кислотный” или “анионный” применяются взаимозаменяемо для обозначения аминокислот, таких как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота.

[34] Используемый в данном документе термин “аминокислота” относится к органическому соединению, которое содержит функциональные аминогруппу ($-NH_3$) и карбоксилатную группу ($-CO_2$), а также боковую цепь (R-группу), специфичную для каждой аминокислоты. Аминокислотные остатки в полипептидах в определенных случаях обозначаются в данном документе однобуквенными кодами аминокислот, как показано ниже: G - глицин (Gly); P - пролин (Pro); A - аланин (Ala); V - валин (Val); L - лейцин (Leu); I - изолейцин (Ile); M - метионин (Met); C - цистеин (Cys); F - фенилаланин (Phe); Y - тирозин (Tyr); W - триптофан (Trp); H - гистидин (His); K - лизин (Lys); R - аргинин (Arg); Q - глутамин (Gln); N - аспарагин (Asn); E - глутаминовая кислота (Glu); D - аспарагиновая кислота (Asp); S - серин (Ser) или T - треонин (Thr).

[35] Используемые в данном документе термины “основной” и “катионный” применяются взаимозаменяемо для обозначения аминокислот, таких как аргинин, гистидин и лизин.

[36] Используемая в данном документе фраза “толерантный к катионам” относится к пептиду дефензина или варианту пептида дефензина, который проявляет эквивалентную противогрибковую или противомикробную активность *in vitro* или не более чем приблизительно 1,5-, 2-, 3- или 4-кратное снижение противогрибковой или противомикробной активности *in vitro* в присутствии 100 мМ KCl или 100 мМ NaCl по сравнению с противогрибковой активностью пептида дефензина или варианта пептида дефензина в отсутствие KCl или NaCl.

[37] Используемая в данном документе фраза “консенсусная последовательность” относится к аминокислотной последовательности, последовательности ДНК или РНК, созданным путем выравнивания двух или более гомологичных последовательностей и получения новой последовательности, имеющей либо консервативные, либо набор альтернативных аминокислотных остатков, остатков дезоксирибонуклеиновой кислоты или рибонуклеиновой кислоты гомологичных последовательностей в каждом положении в созданной последовательности.

[38] Используемые в данном документе фразы “борьба с повреждением микроорганизмами”, “борьба или контроль повреждения микроорганизмами” или “контроль повреждения микроорганизмами” относятся к уменьшению повреждения культурного растения или продукта культурного растения, обусловленного заражением патогеном-микроорганизмом. В более общем смысле, эти фразы относятся к уменьшению нежелательных эффектов, вызванных присутствием патогенного микроорганизма в культурном растении. Подразумевается, что нежелательные эффекты роста

микроорганизмов включают любой тип повреждения или некроза растительных тканей, любой тип снижения урожайности растений, любое снижение ценности продукта культурного растения и/или продуцирование нежелательных метаболитов микроорганизмов или побочных продуктов роста микроорганизмов, включая микотоксины.

[39] Фраза “пептид дефензина” используется в данном документе для обозначения пептида, содержащего консервативный гамма-коровый пептид. Растительные дефензины ранее были охарактеризованы как содержащие консервативную последовательность гамма-корового пептида GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9), где X представляет собой любой аминокислотный остаток (Lacerda et al.), или консервативную последовательность варианта гамма-корового пептида GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10), где X представляет собой любой аминокислотный остаток. В определенных вариантах осуществления пептиды дефензина, раскрытые в данном документе, также могут включать нестандартные гамма-коровые пептиды дефензина, содержащие GXCX3-12C (SEQ ID NO: 590) или GXCX3-15C (SEQ ID NO: 591). Таким образом, как используется в настоящем изобретении, растительный дефензин, или дефензин, или С-концевой пептид, содержащий его фрагмент, может содержать консервативную последовательность гамма-корового пептида GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9), GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10), GXCX3-12C (SEQ ID NO: 590) или GXCX3-15C (SEQ ID NO: 591), где X представляет собой любой аминокислотный остаток. Пептиды дефензина включают белки, которые являются противомикробными, которые могут пермеабиллизировать плазматические мембраны, которые могут связывать фосфолипиды, которые могут связывать сфинголипиды или которые могут проявлять любую комбинацию этих свойств. Пептид дефензина может быть встречающимся в природе или не встречающимся в природе (например, синтетическим и/или химерным).

[40] Фраза “вариант пептида дефензина” используется в данном документе для описания модифицированного пептида дефензина, включающего либо (i) консервативный гамма-коровый пептид под SEQ ID NO: 9 или 10 и по меньшей мере одну аминокислотную замену в исходном пептиде дефензина, либо (ii) модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-8(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном

документе, являются менее чем полноразмерными пептидами дефензина (например, пептидами, содержащими, состоящими по сути или состоящими из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков).

[41] Фраза “эталонный С-концевой пептид дефензина” используется в данном документе для обозначения менее чем полноразмерного пептида дефензина, содержащего консервативную последовательность гамма-корового пептида GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9), консервативную последовательность варианта гамма-корового пептида GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10), нестандартную гамма-коровую последовательность GXCX3-12C (SEQ ID NO: 590) или нестандартную гамма-коровую последовательность GXCX3-15C (SEQ ID NO: 591) и два дополнительных консервативных цистеиновых остатка, расположенных со стороны С-конца последовательности гамма-корового пептида, где цистеин, расположенный ближе всего к N-концу эталонного С-концевого пептида дефензина, соответствует цистеину, расположенному ближе всего к N-концу гамма-коровой последовательности под SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. Примеры эталонных С-концевых пептидов дефензина включают С-концевой пептид MtDef4 (SEQ ID NO: 8), С-концевой пептид MtDef5A (SEQ ID NO: 16), С-концевой пептид MtDef5B (SEQ ID NO: 41), пептид MtDef6 (SEQ ID NO: 21), С-концевой пептид OeDef1 (SEQ ID NO: 24), С-концевой пептид OeDef7 (SEQ ID NO: 27), С-концевой пептид SbDef1 (SEQ ID NO: 30), С-концевой пептид NaD1 (SEQ ID NO: 37), С-концевой пептид RsAFP2 (SEQ ID NO: 38), С-концевой пептид DmAMP1 (SEQ ID NO: 39) и HsAFP1 (SEQ ID NO: 40). Другие примеры эталонных С-концевых пептидов дефензина включают SEQ ID NO: 89-122. Эталонные С-концевые пептиды дефензина, таким образом, включают 4 консервативных цистеиновых остатка, которые называются в данном документе C1 (самый N-концевой как в пептиде, так и в последовательности гамма-корового пептида), C2 (С-концевой относительно C1 и расположенный в последовательности гамма-корового пептида), C3 (С-концевой относительно C2) и C4 (С-концевой относительно C3). Выравнивание неограничивающей подгруппы эталонных С-концевых пептидов дефензина, содержащих консервативную последовательность гамма-корового пептида и цистеины C1, C2, C3 и C4, показано на фиг. 2. Выравнивание неограничивающей подгруппы эталонных С-концевых пептидов дефензина, содержащих консервативную последовательность гамма-корового пептида и цистеины C1, C2, C3 и C4, гамма-коровой консенсусной последовательности, содержащей цистеины C1 и C2, и определенных модифицированных гамма-коровых консенсусных последовательностей, представленных в данном документе, показано на фиг. 3. Другие эталонные С-концевые пептиды дефензина включают таковые, которые содержатся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576.

[42] Используемые в данном документе термины “редактировать”, “осуществление редактирование”, “отредактированный” и т. п. относятся к процессам или продуктам, в которых в геном вводятся вставки, делеции и/или нуклеотидные замены. Такие процессы включают способы индуцирования гомологичной репарации и/или негомологичного соединения концов одного или нескольких сайтов в геноме.

[43] Фразы “генетически отредактированное растение” или “редактированное растение” используются в данном документе для обозначения растения, содержащего одну или несколько нуклеотидных вставок, делеций, замен или любую их комбинацию в геномной ДНК растения. Такие генетически отредактированные растения могут быть сконструированы с помощью методик, включая редактирование, опосредованное CRISPR/Cas-эндонуклеазой, редактирование, опосредованное мегануклеазой, редактирование, опосредованное сконструированной эндонуклеазой с цинковыми пальцами, и т. п.

[44] Термин “гетерологичный”, используемый в данном документе в контексте второго полинуклеотида, который функционально связан с первым полинуклеотидом, относится ко (i) второму полинуклеотиду, полученному из источника, отличного от источника первого полинуклеотида; (ii) второму полинуклеотиду, полученному из того же источника, что и первый полинуклеотид, где первая, вторая или обе полинуклеотидные последовательности модифицированы по сравнению с их исходной формой; (iii) второму полинуклеотиду, расположенному в порядке и/или ориентации или в геномном положении или окружении по отношению к первому полинуклеотиду, которые отличаются от порядка и/или ориентации или геномного положения или окружения первого и второго полинуклеотидов во встречающейся в природе клетке; или (iv) второму полинуклеотиду, не встречающемуся во встречающейся в природе клетке, содержащей первый полинуклеотид. Гетерологичные полинуклеотиды включают полинуклеотиды, которые способствуют транскрипции (например, промоторы и энхансерные элементы), обилию транскриптов (например, интроны, 5'UTR и 3'UTR), трансляции или их комбинации, а также полинуклеотиды, кодирующие варианты пептида дефензина или пептиды дефензина, спейсерные пептиды или пептиды локализации. В определенных вариантах осуществления ядерный или пластидный геном может содержать первый полинуклеотид, где второй полинуклеотид является гетерологичным по отношению к ядерному или пластидному геному. “Гетерологичный” полинуклеотид, который способствует транскрипции, обилию транскриптов, трансляции или их комбинации, а также полинуклеотиды, кодирующие варианты пептида дефензина или пептиды дефензина, спейсерные пептиды или пептиды локализации, могут быть аутологичными по отношению к клетке, но, однако, расположены в порядке и/или ориентации или в геномном положении или окружении, которые отличаются от порядка и/или ориентации или геномного положения или окружения во встречающейся в природе клетке. Полинуклеотид, который способствует транскрипции, обилию транскриптов, трансляции или их комбинации, а также полинуклеотиды, кодирующие варианты пептида дефензина или пептиды дефензина, спейсерные пептиды или пептиды локализации, могут быть гетерологичными по отношению к другому полинуклеотиду, если полинуклеотиды функционально не связаны друг с другом во встречающейся в природе клетке. Гетерологичные пептиды или белки включают пептиды или белки, которые не встречаются в клетке или организме в том виде, в котором они находятся во

встречающихся в природе клетке или организме. В связи с этим, гетерологичные пептиды или белки включают пептиды или белки, которые локализованы в субклеточном местоположении, внеклеточном местоположении или экспрессированы в ткани, которые отличаются от субклеточного местоположения, внеклеточного местоположения или ткани, где пептид находится во встречающихся в природе клетке или организме. Гетерологичные полинуклеотиды включают полинуклеотиды, которые не встречаются в клетке или организме в том виде, в котором они находятся во встречающихся в природе клетке или организме.

[45] Используемые в данном документе фразы “подавление роста патогенного для растений микроорганизма”, “подавление роста микроорганизмов” и т. п. относятся к способам, которые приводят к любому измеримому снижению роста микроорганизмов, где рост микроорганизмов включает любое измеримое снижение количеств и/или степени распространения клеток микроорганизмов, спор, конидий или мицелия. Используемое в данном документе “подавление роста патогенного для растений микроорганизма” также означает любое измеримое снижение нежелательных эффектов, вызываемых ростом микроорганизмов в растении. Нежелательные эффекты роста микроорганизмов в растении включают любой тип повреждения или некроза растительных тканей, любой тип снижения урожайности растений, любое снижение ценности продукта культурного растения и/или продуцирование нежелательных метаболитов микроорганизмов или побочных продуктов роста микроорганизмов, включая микотоксины. Используемая в данном документе фраза “подавление роста микроорганизмов” и т. п., если не указано иное, может включать подавление в растении, человеке или животном.

[46] Используемые в данном документе фразы “процентная идентичность” или “идентичность последовательности” означают количество элементов (т. е. аминокислот или нуклеотидов) в последовательности, которые идентичны в пределах определенной длины двух сегментов ДНК, РНК при выравнивании, приводящем к максимальному числу идентичных элементов, и она рассчитывается путем деления числа идентичных элементов на общее число элементов в определенной длине выровненных сегментов и умножения на 100.

[47] Фраза “трансгенный” относится к организму или его потомку, когда ДНК ядерного генома или генома органеллы организма или организма потомка содержит вставленную экзогенную молекулу ДНК длиной 10 или более нуклеотидов. Фраза “трансгенное растение” относится к растению или его потомку, когда ДНК ядерного или пластидного генома растения или растения-потомка содержит введенную экзогенную молекулу ДНК длиной 10 или более нуклеотидов. Такие введенные экзогенные молекулы ДНК могут быть встречающимися в природе, не встречающимися в природе (например, синтетическими и/или химерными), из гетерологичного источника или из аутологичного источника.

[48] В той степени, в которой любое из предыдущих определений не согласуется с определениями, приведенными в любом патентном или непатентном источнике,

включенном в данный документ посредством ссылки, в любом патентном или непатентном источнике, процитированном в данном документе, или в любом патентном или непатентном источнике, встречающемся в другом месте, подразумевается, что в данном документе будет использоваться предыдущее определение.

[49] Дополнительное описание

[50] В данном документе представлены противомикробные пептиды и белки, называемые вариантами пептида дефензина. Противомикробные пептиды и белки можно наносить непосредственно на растение, корма или пищевые продукты; наносить на растение в виде микроорганизмов, которые продуцируют вариант пептида или белок дефензина, или растения можно подвергать генетическому редактированию, чтобы они продуцировали варианта пептида или белок дефензина. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным или отредактированным полинуклеотидам, микроорганизмам и растениям, трансформированным с помощью рекомбинантных или отредактированных полинуклеотидов, растениям, содержащим генетически отредактированные ядерные или пластидные геномы, кодирующие варианты пептида и белки дефензина, и композициям, содержащим варианты пептида и белки дефензина, применимым для контроля патогенных микроорганизмов, включая патогенные микроорганизмы растений. В определенных вариантах осуществления вариант белка дефензина, содержащий два варианта пептида дефензина или вариант пептида дефензина и другой пептид (включая вариант пептида дефензина или пептид дефензина), может обеспечить улучшенное подавление роста микроорганизмов по сравнению с белком, содержащим только один из противомикробных пептидов, находящихся в варианте белка дефензина. В определенных вариантах осуществления варианты пептида и белки дефензина, представленные в данном документе, являются толерантными к катионам. Такие толерантные к катионам дефензины могут быть более эффективными, чем катионочувствительные дефензины, в обеспечении эффективного контроля патогенных для растений микроорганизмах у трансгенных культур. Толерантные к катионам дефензины, представленные в данном документе, могут функционировать (например, подавлять патогенные для растений микроорганизмы, включая грибковые патогены) в нормальной богатой катионами физиологической среде растительных тканей. Толерантные к катионам дефензины, представленные в данном документе, также могут функционировать (например, подавлять патогенные микроорганизмы, включая грибковые патогены) в нормальной богатой катионами физиологической среде субъекта (например, человека или животного), зараженного патогенными микроорганизмами.

[51] В данном документе представлены рекомбинантные полинуклеотиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий первый противогрибковый пептид, функционально связанный с полинуклеотидом, содержащим промотор, который является гетерологичным отношению к полинуклеотиду, кодирующему первый противогрибковый белок. В определенных вариантах осуществления первый противогрибковый пептид представляет собой вариант пептида дефензина.

[52] Варианты пептида дефензина включают пептиды, содержащие, состоящие по сути или состоящие из последовательности Хаа1-G-Хаа3-С-Хаа5-Хаа6-Хаа7-Хаа8-Хаа9-Хаа10-Хаа11-Хаа12-Хаа13-Хаа14-Хаа15-Хаа16-Хаа17-Хаа18-Хаа19-Хаа20-Хаа21-Хаа22-Хаа23, где Хаа1 представляет собой F, G или отсутствует; Хаа3 представляет собой A, G, Y, H, S, R или Dab; Хаа5 представляет собой H, L, S, N, R, K или Dab; каждый из Хаа6, Хаа7, Хаа8, Хаа9, Хаа10, Хаа11, Хаа12, Хаа13, Хаа14 и Хаа15 независимо представляет собой R, K, H, N, D, F, G, Q, P, A, I, L, V, Y, S или Dab, где один или несколько из Хаа8, Хаа9, Хаа10, Хаа11, Хаа12, Хаа13, Хаа14 и/или Хаа15 может отсутствовать; Хаа16 представляет собой C, V, W, Y или F; Хаа17 представляет собой L, I, W, Y или F; Хаа18 представляет собой C, V, W, Y или F; Хаа19 представляет собой K, T, F, W или Y; Хаа20 представляет собой R, K, T, L, F, Q или Dab, Хаа21 представляет собой N, H, K, R, P, Q, I, F, W или Y; Хаа22 представляет собой N, H, K, P, Q, I, F, W, Y или отсутствует; и Хаа23 представляет собой C и необязательно амидирован, где Dab представляет собой диаминамасляную кислоту (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления пептиды, содержащие SEQ ID NO: 1, могут дополнительно содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, расположенных со стороны С-конца относительно С-конца SEQ ID NO:1, где указанные С-концевые аминокислоты необязательно амидированы. В определенных вариантах осуществления пептиды, содержащие SEQ ID NO: 1, могут содержать модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXСХ3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXСХ3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34). GXСХ3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXСХ3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44). Варианты пептида дефензина также включают пептиды, охватываемые последовательностью Хаа1-GRC-Хаа5-GFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)XXXС-(NH₂), где Хаа1 представляет собой F, G или отсутствует; Хаа5 представляет собой R или K; Хаа14 представляет собой T, F, W или Y; Хаа15 представляет собой R, K или Dab; Хаа16 представляет собой I, F, W или Y; и Хаа17 представляет собой C и необязательно амидирован, где Dab представляет собой диаминамасляную кислоту (SEQ ID NO: 14). Варианты пептида дефензина дополнительно включают пептиды, охватываемые последовательностью Хаа1-G-Хаа2-С-Хаа5-Хаа6-Хаа7-GF-Хаа10-Хаа11-Хаа12-(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)-Хаа16-Хаа17-Хаа18-С-(NH₂), где Хаа1 представляет собой F, G или отсутствует, Хаа3 представляет собой A, F, W, Y или отсутствует; Хаа5 представляет собой H, R или K; Хаа6 представляет собой R или K; Хаа7 представляет собой Q, R или K; Хаа10 представляет собой G, R или K; Хаа11 представляет собой F, W, Y, R или K; Хаа12 представляет собой A, F, W, Y, R или K; Хаа16 представляет собой F, W, Y, R или K; Хаа17 представляет собой R или K; Хаа18 представляет собой R или K; и С-концевой цистеин необязательно амидирован (SEQ ID NO: 17). Варианты пептида дефензина, изложенные в данном документе, не содержат соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина дикого типа под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41. В таблице 1 изложены варианты пептидов дефензина под SEQ ID NO: 1, 3-7 11, 13 и 14, а также пептиды GMA4C под SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:8. В

определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков.

Таблица 1. Пептиды дефензина и варианты пептидов дефензина

SEQ ID NO:	Пептид	Последовательность ³	Суммарный заряд	Гидрофобность
1	Вариант пептида дефензина	$X_1GX_3CX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}C-(NH_2)$, где X_1 представляет собой F, G или отсутствует; X_3 представляет собой A, G, Y, H, S, R или Dab; X_5 представляет собой H, L, S, N, R, K или Dab; каждый из $X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}$ и X_{15} независимо представляет собой R, K, H, N, D, F, G, Q, P, A, I, L, V, Y, S или Dab, где один или несколько из $X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}$ и/или X_{15} может отсутствовать; X_{16} представляет собой C, V, W, Y или F; X_{17} представляет собой L, I, W, Y или F; X_{18} представляет собой C, V, W, Y или F; X_{19} представляет собой K, T, F, W или Y; X_{20} представляет собой R, K, T, L, F, Q или Dab, X_{21} представляет собой N, H, K, R, P, Q, I, F, W или Y; X_{22} представляет собой N, H, K, P, Q, I, F, W, Y или отсутствует; и C_{23} необязательно амидирован		
2	GMA4C_AC	GGRCRGFRRRCFCTTHC-NH ₂	5,5	12%
3	GMA4C_V1A	GGRCRGFRRRCFCTRIC-NH ₂	6	18%
4	GMA4C_V2A	GGRCRGFRRRCFCTRIC-NH ₂	6	18%

5	GMA4C_V3A ¹	GGRCRGFRRRVFVTRIC-NH ₂	6	29%
6	GMA4C_V4A	FGRCRGFRRRCFCWRWC-NH ₂	6	29%
7	GMA4C_V5A ²	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC-NH ₂	6	29%
8	GMA4AC	GRCRGFRRRCFCTTHC	5,5	12%
9	Гамма- коровая консенсусная последовательность 1	GXCX3-9C		
10	Гамма- коровая консенсусная последовательность 2	GXCX3-10C		
11	GMA4C_V4	FGRCRGFRRRCFCWRWC	6	29%
12	GMA4C_V5 ²	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC		
13	GMA4C_V6A ¹	GGRCCKGFRRRWFWTRIC-NH ₂	6	29%
14	GMA4C_V7	XGRCKGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) XXXC-(NH ₂)		
15	GMA4C_V8A	GGRCCKGFRRRWYWTRIC-NH ₂	6	29%
16	GMA5A	GACHRQGFGFACFCYKKC	3,5	33%
17	GMA5A_V1	XGXCVXXGFXXXFXXXC-(NH ₂)		
18	GMA5A_V2_	GACHRQGFGF(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) YKKC-(NH ₂)	3,5	44%
19	GMA5A_V3	GACHRQGFGFVFWYKKC-NH ₂	3,5	44%
20	GMA5A_V4	GACHRQGFGFVFFYKKC-NH ₂	3,5	44%
21	GMA6C	GGRCRGFRRRCFCTRPC	+6	12%
22	GMA6C_V1	GGRCRGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) TRPC-(NH ₂)	+6	23,5%
23	GMA6C_V2	GGRCRGFRRRWFWTRPC-NH ₂	+6	23,5%

24	GMAOe1C	GACLKNRHSKHYGCYCYRHCY	5,5	32%
25	GMAOe1C_V1	GACLKNRHSKHYG(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)YYRHCY-(NH ₂)	5,5	41%
26	GMAOe1C_V2	GACLKNRHSKHYGFWFYRHCY-NH ₂	5,5	41%
27	GMAOe7C	GGLCRGFRRRCFCTKHC	5,5	18%
28	GMAOe7C_V1	GGLCRGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)TKHC-(NH ₂)	5,5	29%
29	GMAOe7C_V2	GGLCRGFRRRWFWTKHC-NH ₂	5,5	29%
30	GMASb1C	GGYCSSRRQICKCTLQC	3	18%
31	GMASb1C_V1	GGYCSSRRQI(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)TLQC-(NH ₂)	2	35%
32	GMASb1C_V2	GGYCSSRRQIWFWTLQC-NH ₂	2	35%
33	Модифицированная гамма-коровая консенсусная последовательность 1	GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
34	Модифицированная гамма-коровая консенсусная последовательность 2	GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
35	GMA1C	GRCRDDFRCWCTKNC	+2	13%
36	GMA1C_V1	GRCRILFRCFCTKNC	+4	27%
37	GMANaD1C	GHCSKILRRCLCTKPC	+4,5	19%
38	GMARsAFP2C	GSCNYVFPAHKCICYFPC	+1,5	39%
39	GMADmAMP1C	GACHVRNGKHMCFYFNC	+3	33%

40	GMAHsAFP1	GACHYQFPSVKCFCTQNC	+1,5	28%
41	GMA5B	GACHRQGIGFACFKKKC	+4,5	28%
42	GMAOe1_V3	GACLKNRHSKHYGFFWYYRHCV	+5,5	36%
43	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 3	GXCX3-8 (F/W/Y)		
44	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 4	GXCX3-9(F/W/Y)		
45	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 5	GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)		
46	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 6	GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)		
47	Модифициро	GXCX3-8(L/V/I/M) (F/W/Y)(L/V/I/M)		

	ванная гамма- коровая консенсусная последовательность 7			
48	Модифицированная ванная гамма- коровая консенсусная последовательность 8	GXCX3-10(L/V/I/M) (F/W/Y)(L/V/I/M)		
49	Модифицированная ванная гамма- коровая консенсусная последовательность 9	GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M)		
50	Модифицированная ванная гамма- коровая консенсусная последовательность 10	GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M)		
51	Модифицированная ванная гамма- коровая консенсусная последовательность	GXCX3- 8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)		

	льность 11			
52	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 12	GXCX3- 10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)		
587	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 13	GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
588	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 14	GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
589	Модифициро ванная гамма- коровая консенсусная последовате льность 15	GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
590	Нестандартн ый гамма- коровый	GXCX3-12C		

	пептид 1 дефензина		
591	Нестандартный гамма- коровый пептид 2 дефензина	GXCX3-15C	

¹ Замена цистеина по Xaa11 и Xaa13 валином (GMA4C_V3A; SEQ ID NO: 5) или триптофаном (GMA4C_V6; SEQ ID NO: 13) может обеспечивать циклический пептид с помощью дисульфидной связи между цистеиновым остатком 4 и цистеиновым остатком 17.

² Dab=диаминомасляная кислота.

³ Статус амидирования: -NH₂ представляет собой С-концевой амидированный пептид, а -(NH₂) представляет собой необязательно амидированный С-концевой пептид

[53] В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина по настоящему изобретению характеризуются как содержащие гамма-коровый пептид дефензина, который вовлечен в противогрибковую активность растительных дефенинов. Гамма-коровый пептид, как правило, содержит суммарный положительный заряд и имеет по меньшей мере одну гидрофобную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления вариант пептида дефензина может содержать гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-9C, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 9). В определенных вариантах осуществления вариант пептида дефензина содержит гамма-коровый пептид, характеризующийся вариантом гамма-коровой консенсусной последовательности GXCX3-10C, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления вариант пептида дефензина содержит гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO:10); где X предпочтительно выбран из катионных и/или гидрофобных аминокислот. В определенных вариантах осуществления вариант пептида дефензина содержит SEQ ID NO: 1, содержит гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10); где X предпочтительно выбран из катионных и/или гидрофобных аминокислот, где любой из переменных (Xaa) аминокислотных остатков под SEQ ID NO:1 содержит аминокислотные остатки, которые сохраняют или увеличивают число катионных и/или гидрофобных аминокислот, находящихся в SEQ ID NO: 3-7. Считается, что гамма-коровый пептид вовлечен в связывание фосфолипидов и/или сфинголипидов, при этом специфические аминокислоты за пределами гамма-корового мотива также вовлечены в связывание фосфолипидов и сфинголипидов. Что касается SEQ ID NO: 1, последовательность между первым цистеином (C1) и вторым цистеином (C2) от

аминоконца (или в определенных вариантах осуществления соответствующая область в варианте пептида дефензина) также вносит вклад в противомикробную активность.

[54] Варианты пептида дефензина, содержащие вариант С-концевых пептидов дефензина, представленные в данном документе, также могут содержать замены одного или нескольких консервативных цистеиновых остатков в последовательности С-концевого пептида дефензина дикого типа. Консервативные цистеиновые остатки, которые могут быть заменены, могут соответствовать С1, С2, С3 или С4 в С-концевом пептиде дефензина, при этом С1 является самым N-концевым цистеином, С2 является 2^м самым N-концевым цистеином, С3 является 3^м самым N-концевым цистеином, и С4 является самым С-концевым цистеином; см. фиг. 2). Неограничивающая подгруппа эталонных С-концевых пептидов дефензина, которые содержат консервативные цистеины С1, С2, С3 и С4, включает пептид GMA4C под SEQ ID NO: 8, пептид MtDef5A под SEQ ID NO: 16, пептид MtDef5A под SEQ ID NO: 41, пептид MtDef6 под SEQ ID NO: 20, пептид OeDef1 под SEQ ID NO: 23, пептид OeDef7 под SEQ ID NO: 26, пептид SbDef1 под SEQ ID NO: 29, С-концевой пептид NaD1 (SEQ ID NO: 37), С-концевой пептид RsAFP2 (SEQ ID NO: 38), С-концевой пептид DmAMP1 (SEQ ID NO: 39) и HsAFP1 (SEQ ID NO: 40), и они могут быть заменены в по меньшей мере положениях С2 и/или С3 с получением варианта пептида дефензина. Дополнительные неограничивающие эталонные С-концевые пептиды дефензина, которые содержат консервативные цистеины С1, С2, С3 и С4, включают С-концевые пептиды дефензина, изложенные под SEQ ID NO: 89-122. Дополнительные неограничивающие эталонные С-концевые пептиды дефензина, которые содержат консервативные цистеины С1, С2, С3 и С4, включают С-концевые пептиды дефензина, содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576.

[55] В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, не будут иметь канонической гамма-коровой консенсусной последовательности GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, будут содержать замену на триптофан, тирозин или фенилаланин С-концевого цистеинового остатка гамма-коровой консенсусной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10 (например, С2 в эталонной последовательности под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89-122). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, содержат замену обоих остатков С2 и С3, соответствующих остаткам С2 и С3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89-122). Вариант GMA4C, имеющий замену на валин в С2 и С3, изложен под SEQ ID NO: 5. Вариант GMA4C, имеющий замену на триптофан в С2 и С3, изложен под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, содержат замену на триптофан, тирозин или фенилаланин остатков С2 и С3, соответствующих остаткам С2 и С3 в

эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89-122). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, изложенные в данном документе, могут дополнительно содержать триптофановый, тирозиновый или фенилаланиновый остаток в аминокислотном положении, расположенном между остатками C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41, 89-122). Варианты пептида дефензина, изложенные в данном документе, содержащие замену на триптофан, тирозин или фенилаланин остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина, могут содержать модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44). В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из пептида, соответствующего С-концу пептида дефензина, содержащего консервативные цистеины C1, C2, C3 и C4 (например, под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41, 89-122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576), где замена на триптофан, тирозин или фенилаланин остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина, может приводить к варианту пептида дефензина, содержащему модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), и необязательно содержат пептид, имеющий только два (2) цистеиновых остатка, соответствующих консервативным цистеинам C1 и C4 эталонного С-концевого пептида дефензина.

[56] В определенных вариантах осуществления представлены дополнительные варианты пептида дефензина, не имеющие канонической гамма-коровой консенсусной последовательности GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, будут содержать замену на триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин или метионин С-концевого цистеинового остатка гамма-коровой консенсусной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10 (например, C2 в эталонной последовательности под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89-122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-

576). В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, содержат независимую замену обоих остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89 122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576), на триптофановый, тирозиновый, фенилаланиновый, лейциновый, изолейциновый, валиновый или метиониновый остаток. В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, представленные в данном документе, содержат замены остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41 или 89 122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576), на триптофановый, тирозиновый, фенилаланиновый, лейциновый, изолейциновый, валиновый или метиониновый остаток. В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина, изложенные в данном документе, могут дополнительно содержать триптофановый, тирозиновый, фенилаланиновый, лейциновый, изолейциновый, валиновый или метиониновый остаток в аминокислотном положении, расположенном между остатками C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина (например, под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41, 89-122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576). Варианты пептида дефензина, изложенные в данном документе, содержащие независимые замены на триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин или метионин остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина, могут приводить к варианту пептида дефензина, содержащему модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52). В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из пептида, соответствующего С-концу пептида дефензина, содержащего консервативные цистеины C1, C2, C3 и C4 (например, под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41, 89-122 или содержащиеся в полноразмерных пептидах дефензина под SEQ ID NO: 123-434 и 436-576), где независимая замена на триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин, валин, изолейцин или метионин остатков C2 и C3, соответствующих остаткам C2 и C3 в эталонном С-концевом пептиде дефензина, может приводить к варианту пептида дефензина, содержащему модифицированный вариант гамма-коровой последовательности

под SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 или 52, и необязательно содержат пептид, имеющий только два (2) цистеиновых остатка, соответствующих консервативным цистеинам C1 и C4 эталонного С-концевого пептида дефензина.

[57] В определенных вариантах осуществления вариант пептида дефензина содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную или С-концевую последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, 41, 123 до 434, или 436 до 576. В определенных вариантах осуществления такие варианты пептида дефензина, которые будут характеризоваться по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, дополнительно содержат гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO:10); где X представляет собой любую аминокислоту, или где X выбран из катионных и/или гидрофобных аминокислот. В определенных вариантах осуществления такие варианты пептида дефензина, которые будут характеризоваться по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95% или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, дополнительно содержат модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52). В определенных вариантах осуществления такие варианты пептида дефензина, которые будут характеризоваться по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95% или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 3-7, 2-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, характеризуются суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере приблизительно 5,8 при нейтральном рН, и/или процентом гидрофобности по меньшей мере приблизительно 15%. В определенных вариантах осуществления первой структурной особенностью вариантов

пептида дефензина является суммарный положительный заряд при нейтральном рН. В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина будут характеризоваться суммарным положительным зарядом при нейтральном рН, составляющим по меньшей мере +2, +3, +3,5, +4, +5, +6, +7, +8, +9 или +10. В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина будут характеризоваться суммарным положительным зарядом при нейтральном рН, составляющим от по меньшей мере +3, +3,5, +4, +5, +6 или +7 до приблизительно +8, +9 или +10. В определенных вариантах осуществления процент гидрофобности таких вариантов пептида дефензина составляет от по меньшей мере приблизительно 15% до 30%, от приблизительно 16% до 19% или от приблизительно 28% до 30%. В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления любые из упомянутых выше вариантов пептида дефензина содержат пептид, имеющий только два (2) цистеиновых остатка, и необязательно содержат два цистеиновых остатка, соответствующих консервативным цистеинам C1 и C4 эталонного С-концевого пептида дефензина.

[58] В определенных вариантах осуществления варианты пептида дефензина содержат аминокислотные замены, которые повышают или сохраняют суммарный положительный заряд пептида при нейтральном рН и/или повышают или сохраняют гидрофобность пептида. Аминокислотные замены в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, которые могут сохранять суммарный положительный заряд пептида при нейтральном рН, включают замену лизинового, аргининового остатка или остатка Dab (диаминомасляной кислоты) в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584 или 585 другим аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из лизина, аргинина, Dab (диаминомасляной кислоты) или другой не встречающейся в природе аминокислоты, которая положительно заряжена при нейтральном рН. Аминокислотные замены в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, которые могут повышать суммарный положительный заряд при нейтральном рН, включают замену полярного (например, цистеинового или треонинового) или неполярного (например, глицинового) остатка в SEQ ID NO: 3-7, 12, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585 другим аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из лизина, аргинина, Dab (диаминомасляной кислоты) или другого не встречающегося в природе аминокислотного остатка, который положительно заряжен при нейтральном рН. Аминокислотные замены в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, которые могут сохранять гидрофобность пептида, включают замену глицинового, валинового, фенилаланинового или изолейцинового остатка в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585 другим

аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, фенилаланина, изолейцина или метионина. Аминокислотные замены в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, которые могут повышать гидрофобность пептида, включают замену полярного (например, цистеинового или треонинового) остатка в SEQ ID NO: 3-7, 12-15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585 другим аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, фенилаланина или изолейцина. В определенных вариантах осуществления такие замены, которые повышают или сохраняют суммарный положительный заряд или гидрофобность пептида, будут предусматривать вариант пептида дефензина, имеющий гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-9C (SEQ ID NO: 9) или GXCX3-10C (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления такие замены, которые повышают или сохраняют суммарный положительный заряд или гидрофобность пептида, будут предусматривать вариант пептида дефензина, имеющий модифицированный вариант гамма-коровой последовательности GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33) или GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589) GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44). В определенных вариантах осуществления такие замены, которые повышают или сохраняют суммарный положительный заряд или гидрофобность пептида, будут предусматривать вариант пептида дефензина, имеющий модифицированный вариант гамма-коровой последовательности, которая может содержать модифицированный вариант гамма-коровой последовательности SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления упомянутые выше варианты пептида дефензина содержат, состоят по сути или состоят из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-22, 24, 16, 28 или 30 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления любые из упомянутых выше вариантов пептида дефензина содержат пептид, имеющий только два (2) цистеиновых остатка, и необязательно содержат два цистеиновых остатка, соответствующих консервативным цистеинам C1 и C4 эталонного С-концевого пептида дефензина.

[59] В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в любой из упомянутых выше или других вариантах последовательностей варианта пептида дефензина замещены другой(-ими) аминокислотой(-ами), заряд и полярность которой(-ых) сходны с зарядом и полярностью исходной аминокислоты, т. е. консервативная аминокислотная замена. Заместители аминокислоты в пределах варианта пептида или белка дефензина или последовательности пептида дефензина могут быть выбраны из других представителей класса, к которому принадлежит первоначально встречающаяся

аминокислота. Аминокислоты можно разделить на следующие четыре группы: (1) кислотные аминокислоты; (2) основные аминокислоты; (3) нейтральные полярные аминокислоты и (4) нейтральные неполярные аминокислоты. Иллюстративные аминокислоты в пределах этих различных групп включают: (1) кислотные (анионные, отрицательно заряженные) аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; (2) основные (катионные, положительно заряженные) аминокислоты, такие как аргинин, гистидин и лизин; (3) нейтральные полярные аминокислоты, такие как глицин, серин, треонин, цистеин, цистин, тирозин, аспарагин и глутамин; (4) нейтральные неполярные (гидрофобные) аминокислоты, такие как аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Консервативные аминокислотные замены в пределах последовательностей пептида дефензина могут быть выполнены путем замены одной аминокислоты в пределах одной из этих групп другой аминокислотой из той же группы. Биологически функциональные эквиваленты вариантов пептида дефензина могут иметь 10 или менее консервативных аминокислотных замен, семь или менее консервативных аминокислотных замен, или пять, четыре, три, две или одну консервативную аминокислотную замену. Таким образом, кодирующая нуклеотидная последовательность (например, ген, плазмидная ДНК, кДНК или синтетическая ДНК) будет иметь соответствующие замены оснований, позволяющие ей кодировать биологически функциональные эквивалентные формы вариантов пептида дефензина. Также представлены определенные полуконсервативные замены в вариантах пептида дефензина, включающие (i) замену нейтрального полярного аминокислотного остатка нейтральным неполярным (гидрофобным) аминокислотным остатком или (ii) замену нейтрального неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка нейтральным полярным аминокислотным остатком. В частности, представлены полуконсервативные замены нейтрального полярного тирозинового остатка остатком гидрофобной аминокислоты. Биологически функциональные эквиваленты вариантов пептида дефензина могут иметь 10 или менее полуконсервативных аминокислотных замен, семь или менее полуконсервативных аминокислотных замен, или пять, четыре, три, две или одну полуконсервативную аминокислотную замену.

[60] Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из упомянутых выше вариантов пептида дефензина. Также в данном документе представлены рекомбинантные молекулы ДНК, содержащие упомянутые выше молекулы нуклеиновой кислоты, и также в данном документе представлены, в частности, рекомбинантные молекулы ДНК, содержащие гетерологичный промотор, который функционально связан с упомянутыми выше молекулами нуклеиновой кислоты.

[61] Вариант пептида дефензина, представленный в данном документе, может быть функционально связан с другим вариантом пептида дефензина, дефензином или противомикробным пептидом через спейсерную пептидную последовательность, которая не восприимчива к расщеплению эндопротеиназой, в том числе растительной эндопротеиназой. Были раскрыты такие пептидные линкерные последовательности,

которые соединяют пептиды в мультимерных или мультидоменных белках (Argos, 1990; George RA, Heringa (2002)). Примеры подходящих пептидных последовательностей из мультимерных или мультидоменных белков, которые могут быть использованы в качестве спейсерных доменов, включают иммуноглобулиновые шарнирные области из иммуноглобулинов, линкер между липофильным и E3-связывающим доменом в пируватдегидрогеназе (Turner et al., 1993), линкер между центральным и С-концевым доменами в цистеинпротеиназе (P9; Mottram et al., 1989) и их функциональные варианты. Спейсерные пептиды для применения в вариантах белков дефензина также могут являться полностью или частично синтетическими пептидными последовательностями. Такие синтетические спейсерные пептиды разработаны для обеспечения гибкой связи между по меньшей мере одним вариантом пептида дефензина и другим пептидом (включая вариант пептида дефензина или пептид дефензина) и устойчивости к расщеплению эндогенными растительными или другими эндопротеиназами. В определенных вариантах осуществления длина синтетического спейсерного пептида может составлять от приблизительно 3, 4, 8, 10, 12 или 16 до приблизительно 20, 24, 28, 30, 40 или 50 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления синтетический спейсерный пептид может содержать пептидную последовательность, богатую глицином или содержащую глицин/серин. Состав и строение пептидов, подходящих для гибкой связи белковых доменов, описанные в литературе (Chen et al., 2013), могут быть адаптированы для применения в качестве спейсерных пептидов в вариантах белков дефензина, представленных в данном документе. Спейсерные пептиды, применимые для соединения мономеров дефензина, описанные в публикациях заявок на патент США US20190194268 и US20190185877, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, также могут быть использованы для соединения вариантов пептида дефензина, раскрытых в данном документе, с другими вариантами пептида дефензина, дефензинами, противомикробными пептидами или другими пептидами.

[62] Вариант пептида дефензина, представленный в данном документе, может быть функционально связан с другим вариантом пептида дефензина, дефензином или противомикробным пептидом через линкерную пептидную последовательность, которая восприимчива к расщеплению эндопротеиназой, в том числе растительной эндопротеиназой. В определенных вариантах осуществления полученный вариант белка дефензина может быть экспрессирован в клетке таким образом, что эндопротеиназа расщепляет вариант белка дефензина с получением по меньшей мере одного варианта пептида дефензина и другого пептида (включая вариант пептида дефензина или пептид дефензина). Такие варианты белки дефензина могут обеспечиваться в клеточном компартменте (например, цитоплазме, митохондри, пластиде, вакуоли или эндоплазматическом ретикулуме) или внеклеточном пространстве (т. е. в апопласте), имеющем эндопротеиназу, которая расщепляет линкерный пептид. Расщепляемые линкерные пептиды, раскрытые в W02014078900, Vasivarama and Kirti, 2013a, Francois et

al, Vasivarama and Kirti, 2013b и WO2017127558, могут использоваться в вариантах белков дефензина, представленных в данном документе.

[63] Можно сконструировать кассеты экспрессии, обеспечивающие экспрессию варианта пептида дефензина в однодольных растениях, двудольных растениях или в тех и других. Конструирование такой кассеты экспрессии варианта пептида дефензина может быть осуществлено либо в растительном векторе экспрессии, либо в геноме растения. Кассеты экспрессии представляют собой ДНК-конструкции, в которых различные промоторные, кодирующие (например, кодирующие вариант пептида дефензина) последовательности и последовательности полиаденилирования функционально связаны. В целом, кассеты экспрессии, как правило, содержат промотор, который функционально связан с представляющей интерес последовательностью, которая функционально связана с областью полиаденилирования или терминаторной областью. В определенных случаях, включая экспрессию рекомбинантных или отредактированных полинуклеотидов в однодольных растениях, также может быть применимым включение интронной последовательности. Если интронная последовательность включена, она, как правило, располагается в 5'-нетранслируемой лидерной области рекомбинантного или отредактированного полинуклеотида. В определенных случаях может быть применимым включение специфических 5'-нетранслируемых последовательностей в рекомбинантный или отредактированный полинуклеотид для повышения стабильности транскрипта или для содействия эффективной трансляции транскрипта. Кассеты и векторы экспрессии для экспрессии других пептидов или белков дефензина в растениях, включая раскрытые в патенте США № 10253328, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, могут быть адаптированы для экспрессии вариантов пептида дефензина в трансгенных растениях. Любой из векторов экспрессии вариантов пептида дефензина может быть введен в хромосомы растения-хозяина с помощью таких способов, как трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, трансформация, опосредованная *Rhizobium*, трансформация, опосредованная *Sinorhizobium*, трансформация, опосредованная частицами, трансфекция ДНК, электропорация ДНК или трансформация, опосредованная “вискерами”. Упомянутые выше способы введения трансгенов описаны в публикации заявки на патент США № 20050289673 (трансформация кукурузы, опосредованная *Agrobacterium*), патенте США № 7002058 (трансформация сои, опосредованная *Agrobacterium*), патенте США № 6365807 (трансформация риса, опосредованная частицами) и патенте США № 5004863 (трансформация хлопчатника, опосредованная *Agrobacterium*), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[64] В определенных вариантах осуществления растение, содержащее рекомбинантный или отредактированный полинуклеотид, кодирующий вариант пептида дефензина, может быть получено с применением методик, обеспечивающих сайт-специфическую вставку гетерологичной ДНК в геном растения (например, с помощью CRISPR, TALEN или редактирования генов, опосредованного нуклеазой с цинковыми

пальцами). В определенных вариантах осуществления фрагмент ДНК, кодирующий по меньшей мере вариант пептида дефензина, сайт-специфически интегрируется в геном растительной клетки, ткани, части или целого растения для создания последовательности в пределах данного генома, которая кодирует вариант пептида дефензина. Примеры способов вставки чужеродной ДНК в специфические сайты в геноме растения с помощью сайт-специфических нуклеаз, таких как мегануклеазы или нуклеазы с цинковыми пальцами, являются такими, как по меньшей мере раскрыто в Voytas, 2013. Примеры способов вставки чужеродной ДНК в геном растения с помощью технологии ассоциированных с кластеризованными регулярно расположенными короткими палиндромными повторами (CRISPR) (Cas)-направляющих РНК и Cas-эндонуклеазы раскрыты в по меньшей мере Svitashv et al., 2015; Murovec et al., 2017; Kumar and Jain, 2015; и в заявке на патент США № 20150082478, которая конкретно включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[65] Экспрессия вариантов пептида дефензина в дрожжах также конкретно предусмотрена в данном документе. Конструирование векторов экспрессии для получения гетерологичных белков в различных родах дрожжей хорошо отработано. В целом, такие векторы экспрессии, как правило, содержат промотор, который функционально связан с представляющей интерес последовательностью, которая функционально связана с областью полиаденилирования или терминаторной областью. Примеры родов дрожжей, которые были использованы для успешной экспрессии гетерологичных генов, включают *Candida*, *Kluveromyces*, *Hansuella*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, и *Yarrowia*. Общее описание векторов экспрессии и систем трансформации для *Saccharomyces* можно найти у Kingsman et al (1985). Векторы экспрессии и системы трансформации, применимые для дрожжей, отличных от *Saccharomyces*, описаны в Reiser et al (1990). Кассеты и векторы экспрессии для экспрессии других пептидов или белков дефензина в дрожжах, включая раскрытые в патенте США № 10253328, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, могут быть адаптированы для экспрессии вариантов пептида дефензина в дрожжах.

[66] Экспрессия вариантов пептида дефензина в бактериях также конкретно предусмотрена в данном документе. Было описано конструирование векторов экспрессии для получения гетерологичных белков в различных бактериальных системах. В целом, такие векторы экспрессии, как правило, содержат промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей представляющую(-ие) интерес пептидную(-ые) последовательность(-и) (например, область сигнального транзитного пептида на N-конце варианта пептида дефензина), которая(-ые) функционально связана(-ы) с прокариотической терминаторной областью. Примеры бактериальных родов, которые были использованы для успешной экспрессии гетерологичных генов, включают системы экспрессии *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, и *Pseudomonas*. *E. coli*, применимые для получения белков, содержащих дисульфидные связи, и которые могут быть адаптированы для применения в

экспрессии вариантов пептида дефензина, представленных в данном документе, включают описанные в Kuddus et al. (2017) *Biotechnol Prog* 233:1520-1528. doi: 10.1002/btpr. Protein Science 2508, Kiedzierska et al. (2008) *Protein Expr Purif* 60, 82-88, Chang et al. (2015) *Amino Acids* 47, 579-587, Buchko et al. (2018) *Protein Science* 27, 1611-1623, Marques et al. (2008) *J Appl Microbiol* 106, 1640-1648, и Pazgier et al. (2006) *Protein Expr Pur* 49, 1-8. Системы для экспрессии белков, содержащих дисульфидные связи, которые могут быть адаптированы для экспрессии пептидов дефензина в *E. coli*, включают раскрытые в публикации заявки на патент США № US 2020/0172915, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, и в Berkmen, M. *Protein Expr Purif*. 2012;82(1):240-51. doi: 10.1016/j.pep.2011.10.009.

[67] Другие бактериальные системы экспрессии для экспрессии, которые применимы для получения белков, содержащих дисульфидные связи, и которые могут быть адаптированы для применения в экспрессии вариантов пептида дефензина, представленных в данном документе, включают описанные в патенте США № 10604761, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[68] Также представлены противомикробные композиции для сельскохозяйственного, фармацевтического или ветеринарного применения, содержащие либо противомикробное для растений, либо противомикробное для человека или для применения в ветеринарии, подавляющее патогенные микроорганизмы количество (“противомикробное эффективное количество”) одного или нескольких выделенных, очищенных противомикробных вариантов пептида дефензина по настоящему изобретению или их биологически функциональных эквивалентов. Такие композиции могут содержать один или любую комбинацию вариантов пептида или белков дефензина, раскрытых в данном документе, и приемлемые в сельскохозяйственной, фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Как указано ниже, в такие композиции могут быть также включены и другие компоненты, имеющие значение в сельскохозяйственном и терапевтическом контекстах. Противомикробные композиции могут быть использованы для подавления роста или уничтожения восприимчивых к варианту пептида дефензина патогенных микроорганизмов, ассоциированных с микробными инфекциями растений, людей или животных. Такие противомикробные композиции могут быть составлены для местного введения, и их наносят местно на растения, окружающую среду растения (включая почву), людей или животных. Такие противомикробные композиции могут быть составлены для энтерального, парентерального и/или внутривенного введения композиции и могут вводиться субъекту, нуждающемуся в этом; при этом таким субъектом может быть человек, домашний скот, домашняя птица, рыба или животное-компаньон. Варианты пептида дефензина могут быть составлены отдельно, в любой комбинации друг с другом, и любой из них может быть дополнительно составлен в комбинации с другими традиционными противомикробными терапевтическими соединениями, такими как, в качестве неограничивающего примера, полиеновые

противомикробные средства; имидазольные, триазольные и тиазольные противомикробные средства; аллиламины и эхинокандины, которые обычно используются в человеческой и ветеринарной медицине. Введение композиций, которые содержат варианты пептида дефензина, субъекту-человеку или субъекту-животному, нуждающемуся в этом, можно осуществлять различными путями, которые включают местное нанесение, энтеральное введение, парентеральное введение и/или внутривенное введение. Противомикробные пептиды и композиции могут применяться для контроля патогенов-микроорганизмов или загрязнений, включая: (i) бактериальный патоген растений или животных, где бактериальный патоген необязательно является представителем группы *Enterobacteriaceae*, и где необязательно бактериальный патоген представляет собой *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.* или *Listeria sp.*; (ii) *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aphenomyces sp.*, *Verticillium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Botrytis sp.*, *Cercospora sp.*, *Phakopsora sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Pythium sp.*, *Phoma sp.*, *Leptosphaeria sp.*, *Gaeumannomyces sp.*, *Puccinia sp.*, *Septoria sp.*, *Penicillium sp.*, *Lasioidiplodia sp.*, *Phomopsis sp.*, *Mycosphaerella sp.*, *Golovinomyces sp.*, *Erisyphe sp.*, *Albugo sp.*, *Setosphaeria sp.*, *Cochliobolus sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Diplodia sp.*, или *Stenocarpella sp.*; (iii) вид *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Saksenaea*, *Rhizomucor*, *Syncephalostrum*, *Cokeromyces*, *Actinomucor*, *Pythium*, *Fusarium*, *Histoplasmosis*, *Coccidiomyces* или *Blastomyces species*; (iv) вид *Candida*, и где вид *Candida* представляет собой *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, или *C. krusei*; или (v) дерматофит, необязательно выбранный из группы, состоящей из *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum flavum*, *Epidermophyton floccosum*, и *Microsporum gypseum*.

[69] Сельскохозяйственные композиции, содержащие любую из молекул варианта пептида дефензина по отдельности или в любой комбинации, могут быть составлены, как описано, например, в Winnacker-Kuchler (1986) *Chemical Technology, Fourth Edition, Volume 7*, Hanser Verlag, Munich; van Falkenberg (1972-1973) *Pesticide Formulations, Second Edition*, Marcel Dekker, N.Y.; и K. Martens (1979) *Spray Drying Handbook, Third Edition*, G. Goodwin, Ltd., London. Технологические добавки, такие как носители, инертные материалы, поверхностно-активные вещества, растворители и другие добавки, также хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Watkins, *Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers, Second Edition*, Darland Books, Caldwell, N.J., and Winnacker-Kuchler (1986) *Chemical Technology, Fourth Edition, Volume 7*, Hanser Verlag, Munich. Используя эти составы, можно также приготовить смеси вариантов пептидов и белков дефензина с другими пестицидно-активными веществами, удобрениями и/или регуляторами роста и т. д. в виде готовых составов или баковых смесей.

[70] Противомикробные варианты пептида дефензина по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с другими активными средствами, могут быть применены к субъектам или растениям в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно

0,1 пг/мл до приблизительно 100 мг/мл или от приблизительно 5 пг/мл до приблизительно 5 мг/мл при рН в диапазоне от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0. Такие композиции могут быть забуферены с применением, например, фосфатных буферов с концентрацией от приблизительно 1 мМ до 1 М, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ или от приблизительно 15 мМ до приблизительно 50 мМ. В случае низких концентраций буфера для увеличения ионной силы можно добавлять соль. В определенных вариантах осуществления соль натрия, в том числе NaCl, находящаяся в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1 М, от приблизительно 1 мМ, 5 мМ или 10 мМ до приблизительно 20 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ или 200 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ, может быть добавлена или обеспечена в композициях, содержащих варианты пептидов и белки дефензина. В определенных вариантах осуществления соль калия, в том числе KCl, находящаяся в диапазоне от приблизительно 1 мМ, 5 мМ или 10 мМ до приблизительно 20 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ или 200 мМ, может быть добавлена или обеспечена в композициях, содержащих варианты пептидов и белки дефензина. В определенных вариантах осуществления соль кальция, в том числе CaCl₂, находящаяся в диапазоне от приблизительно 0,1 мМ, 0,5 мМ или 1 мМ до приблизительно 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ или 20 мМ, может быть добавлена или обеспечена в композициях, содержащих варианты пептида дефензина.

[71] Многочисленные традиционные микробные антибиотики и химические противомикробные средства (например, фунгициды), с которыми можно комбинировать варианты пептидов и белки дефензина по настоящему изобретению, описаны в Worthington and Walker (1983) *The Pesticide Manual, Seventh Edition*, British Crop Protection Council. К ним относятся, например, полиоксины, никкомицины, карбоксамиды, ароматические углеводы, карбоксины, морфолины, ингибиторы биосинтеза стеролов и фосфорорганические соединения. Кроме того, также могут использоваться азолы, триазолы и фунгициды эхинокандины. Другие активные ингредиенты, которые могут быть составлены в комбинации с противомикробными пептидами и белками по настоящему изобретению, включают, например, инсектициды, аттрактанты, стерилизующие средства, акарициды, нематоциды и гербициды. Патент США № 5421839, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, содержит исчерпывающий обзор множества активных средств, с которыми могут быть составлены такие вещества, как противомикробные варианты пептидов и белки дефензина по настоящему изобретению.

[72] Применимые в сельском хозяйстве противомикробные композиции, охватываемые данным документом, также включают композиции в виде клеток-хозяев, таких как бактериальные клетки и клетки микроорганизмов, способные продуцировать варианты пептидов и белки дефензина, и которые могут колонизировать растения, включая корни, побеги, листья или другие части растений. Термин “колонирующий организм” используется в данном документе для обозначения микроорганизма, который способен колонизировать любую часть растения самого по себе

и/или окружающей среды растения, в том числе который может экспрессировать варианты противомикробных пептидов и белки дефензина в растении и/или окружающей среде растения. Колонизирующее растение микроорганизм представляет собой микроорганизм, который может существовать в симбиотических или невредаоносных отношениях с растением в окружающей среде растения. В патент США № 5229112, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, раскрываются различные колонизирующие растение микроорганизмы, которые могут быть сконструированы для экспрессии противомикробных пептидов и белков, и способы их применения, применимые к вариантам противомикробных пептидов и белков дефензина, раскрытым в данном документе. Колонизирующие растение микроорганизмы, экспрессирующие раскрытые в данном документе варианты противомикробных пептидов и белки дефензина, применимые для подавления роста микроорганизмов в растениях, включают бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Bacillus* spp., включая *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus israelensis*, и *Bacillus subtilis*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*; *Pseudomonas* spp.; *Arthrobacter* spp., *Azospyrillum* spp., *Clavibacter* spp., *Escherichia* spp.; *Agrobacterium* spp., например, *A. radiobacter*, *Rhizobium* spp., *Erwinia* spp. *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Alcaligenes* spp., *Rhizobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp. и *Flavobacterium* spp. В определенных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи, выбранные из группы, состоящей из *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Pichia methanolica*. В определенных вариантах осуществления колонизирующее растение микроорганизм может представлять собой эндофитную бактерию или микроорганизм. При применении молекул вариантов пептида дефензина в отношении ризосферы особенно применимы колонизирующие ризосферу бактерии из рода *Pseudomonas*, в частности, флуоресцентные псевдомонады, например, *Pseudomonas fluorescens*, которые особенно конкурентоспособны в ризосфере растений и при колонизации поверхности корней растений в большом количестве. Примерами подходящих бактерий, колонизирующих филлоплан (лист), являются *P. putida*, *P. syringae* и виды *Erwinia*.

Варианты осуществления

[73] Следующие пронумерованные варианты осуществления составляют часть настоящего изобретения.

[74] 1a. Пептид, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 1, где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41; где необязательно указанный пептид содержит модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y), изложенную под SEQ ID NO: 33, GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y), изложенную под SEQ ID NO: 34, GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44); и/или где необязательно С-концевой цистеиновый остаток или С-концевой аминокислотный остаток амидирован.

[75] 1b. Пептид, характеризующийся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 68%, 75%,

82% или 94% идентичностью последовательности по всей длине любой из SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6, где пептид не является идентичным SEQ ID NO: 8, где необязательно любая аминокислотная замена в указанной последовательности увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд при нейтральном pH и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида, и где необязательно С-концевой цистеиновый остаток амидирован.

[76] 1c. Пептид, характеризующийся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 68%, 75%, 82%, 94%, 95% или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO: 7, 12, 13, 14, 15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, где пептид не является идентичным SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41, где необязательно пептид под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585 содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками, и где необязательно любая замена увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд при нейтральном pH и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида, и где необязательно С-концевой цистеиновый остаток или С-концевой аминокислотный остаток амидирован.

[77] 1d. Вариант С-концевого пептида дефензина, содержащий консервативные цистеиновые остатки C1 и C4, соответствующие N-концевому и С-концевому цистеинам эталонного С-концевого пептида дефензина, где консервативные цистеиновые остатки C2 и C3 эталонного С-концевого пептида дефензина независимо замещены триптофаном, тирозином, фенилаланином, лейцином, валином, изолейцином или метионином; и где необязательно вариант пептида дефензина характеризуется суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере 3, 3,5, 4, 5 или 6, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%.

[78] 1e. Вариант С-концевого пептида дефензина, содержащий модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52), где необязательно пептид дополнительно содержит консервативный цистеиновый остаток C4, где необязательно цистеиновый остаток в модифицированной гамма-коровой консенсусной последовательности образует дисульфидную связь с консервативным цистеиновым остатком C4, и/или где необязательно вариант пептида дефензина характеризуется

суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере 3, 3,5, 4, 5 или 6, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%.

[79] 1f. Пептид, содержащий модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 588), GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) ((SEQ ID NO: 589), GXCX3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXCX3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), или GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52), где пептид дополнительно содержит второй С-концевой цистеиновый остаток, расположенный со стороны С-конца относительно цистеинового остатка в модифицированной гамма-коровой консенсусной последовательности, и где пептид характеризуется суммарным положительный зарядом, составляющим по меньшей мере 3, 3,5, 4, 5 или 6, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%, где необязательно пептид содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками.

[80] 2. Пептид согласно варианту осуществления 1a, 1b, 1c, 1d, 1e или 1f, где указанный пептид содержит (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585; где необязательно пептид под SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585 содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками; (ii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 68%, 75%, 82%, 94%, 95% или 100% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, 15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41; и где необязательно пептид содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками; или (iii) где указанный пептид проявляет противомикробную активность.

[81] 3. Пептид согласно варианту осуществления 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f или 2, где пептид содержит, состоит по сути или состоит из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков или (iii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков и содержит два цистеиновых остатка.

[82] 4. Композиция, содержащая пептид согласно любому из вариантов осуществления 1a, 1b, 1c, 1d, 1e или 1f-3 и приемлемые в сельскохозяйственной, фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

[83] 5. Композиция согласно варианту осуществления 4, где пептид обеспечен в концентрации от приблизительно 0,1, 0,5, 1,0 или 5 пг/мл до приблизительно 1, 5, 20, 50 или 100 мг/мл или в концентрации от приблизительно 0,1, 0,5, 1,0 или 5 пг/грамм до приблизительно 1, 5, 20, 50 или 100 мг/грамм, и где необязательно композиция содержит соль натрия в концентрации по меньшей мере 100 мМ и/или соль кальция в концентрации по меньшей мере 2 мМ.

[84] 6. Способ (i) предупреждения или уменьшения повреждения урожая патогенным для растений микроорганизмом; или (ii) предупреждения загрязнения растений, частей растений, семян, полученных из них кормов или полученных из них пищевых продуктов нежелательным микроорганизмом, включающие стадию приведения растения, семени растения или другой части указанного растения, полученных из них пищевых продуктов или полученных из них кормовых продуктов в контакт с эффективным количеством композиции согласно варианту осуществления 4 или варианту осуществления 5.

[85] 7. Способ согласно варианту осуществления 6, где патогенный для растений микроорганизм или нежелательный микроорганизм представляет собой (i) бактериальный патоген растений или животных, где бактериальный патоген необязательно является представителем группы *Enterobacteriaceae*, и где необязательно бактериальный патоген представляет собой *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.* или *Listeria sp.*; или (ii) *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aphenomyces sp.*, *Verticillium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Botrytis sp.*, *Cercospora sp.*, *Phakopsora sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Pythium sp.*, *Phoma sp.*, *Leptosphaeria sp.*, *Gaeumannomyces sp.*, *Puccinia sp.*, *Septoria sp.*, *Penicillium sp.*, *Lasioidiplodia sp.*, *Phomopsis sp.*, *Mycosphaerella sp.*, *Golovinomyces sp.*, *Erysiphe sp.*, *Albugo sp.*, *Setosphaeria sp.*, *Cochliobolus sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Diplodia sp.*, или *Stenocarpella sp.*

[86] 8. Медицинское устройство, содержащее устройство и композицию согласно варианту осуществления 4 или 5, где устройство содержит по меньшей мере одну поверхность, которая сверху покрыта и/или пропитана композицией.

[87] 9. Медицинское устройство согласно варианту осуществления 8, где указанное устройство представляет собой стент, катетер, контактную линзу, презерватив, пластырь или диафрагму.

[88] 10. Способ лечения, предупреждения или подавления микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции согласно варианту осуществления 4 или 5.

[89] 11. Способ согласно варианту осуществления 10, где указанное введение включает местное, энтеральное, парентеральное и/или внутривенное введение

композиции.

[90] 12. Способ согласно варианту осуществления 10 или 11, где субъектом является человек, домашний скот, домашняя птица, рыба или животное-компаньон.

[91] 13. Способ согласно варианту осуществления 12, где микробная инфекция поражает слизистую оболочку, глаз, кожу и/или ноготь, и композицию наносят на слизистую оболочку, глаз, кожу и/или ноготь.

[92] 14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 10-13, где микробная инфекция вызвана дерматофитом, и где дерматофит необязательно выбран из группы, состоящей из *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum flavum*, *Epidermophyton floccosum*, и *Microsporum gypseum*.

[93] 15. Способ согласно любому из вариантов осуществления 10-13, где микробная инфекция вызвана (i) бактериальным патогеном животных, где бактериальный патоген необязательно является представителем группы *Enterobacteriaceae*, и где необязательно бактериальный патоген представляет собой *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.* или *Listeria sp.*; или (ii) видом *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Saksenaia*, *Rhizomucor*, *Syncephalostrum*, *Cokeromyces*, *Actinomucor*, *Pythium*, *Fusarium*, *Histoplasmosis*, *Coccidiomyces* или *Blastomyces*.

[94] 16. Способ согласно любому из вариантов осуществления 10-13, где микробная инфекция вызвана видом *Candida*, и где вид *Candida* представляет собой *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* или *C. krusei*.

[95] 17. Композиция согласно варианту осуществления 4 или 5 для применения в способе лечения, предупреждения или подавления микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом.

[96] 18. Композиция согласно варианту осуществления 17, где субъектом является человек, домашний скот, домашняя птица, рыба или животное-компаньон.

[97] 19. Часть растения, которая по меньшей мере частично покрыта композицией согласно варианту осуществления 4 или 5.

[98] 20. Часть растения согласно варианту осуществления 19, где часть представляет собой семя, и семя необязательно представляет собой семя кукурузы, сои, пшеницы, риса, хлопчатника, *Brassica sp.* или томата.

[99] 21. Часть растения согласно варианту осуществления 19, где часть растения представляет собой фрукт, овощ или цветок.

[100] 22. Рекомбинантный полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, кодирующий противомикробный пептид согласно варианту осуществления 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2 или 3, где полинуклеотид, кодирующий первый противомикробный пептид, функционально связан с полинуклеотидом, содержащим промотор, который является гетерологичным по отношению к полинуклеотиду, кодирующему первый противомикробный пептид, где необязательно любая аминокислотная замена в указанной

последовательности увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида.

[101] 23. Рекомбинантный полинуклеотид согласно варианту осуществления 22, где рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий (i) транзитный пептид, нацеливающий на вакуоли пептид и/или нацеливающий на эндоплазматический ретикулум пептид; (ii) нацеливающий на пластиды пептид; и/или (iii) сигнал полиаденилирования или терминации транскрипции, где полинуклеотиды (i), (ii) и/или (iii) функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим противомикробный пептид.

[102] 24. Рекомбинантный полинуклеотид согласно варианту осуществления 22 или 23, где полинуклеотид, кодирующий первый противомикробный пептид, вставлен в гетерологичный ядерный или пластидный геном клетки и функционально связан с эндогенным промотором, расположенным в гетерологичном ядерном или пластидном геноме.

[103] 25. Ядерный или пластидный геном растения, содержащий полинуклеотид, кодирующий противомикробный пептид согласно варианту осуществления 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2 или 3, и где полинуклеотид является гетерологичным по отношению к ядерному или пластидному геному, и где полинуклеотид функционально связан с эндогенным промотором ядерного или пластидного генома.

[104] 26. Клетка, содержащая рекомбинантный полинуклеотид согласно варианту осуществления 22 или геном согласно варианту осуществления 25, где клетка необязательно представляет собой бактериальную, дрожжевую или растительную клетку.

[105] 27. Растение, содержащее рекомбинантный полинуклеотид согласно варианту осуществления 22 или геном согласно варианту осуществления 25.

[106] 28. Часть растения из растения согласно варианту осуществления 26, где часть растения содержит рекомбинантный полинуклеотид или геном, где необязательно часть растения представляет собой семя, стебель, лист, корень, клубень, цветок или плод.

[107] 29. Способ получения семени растения, которое обеспечивает растения, устойчивые к заражению патогенным для растений микроорганизмом, который включает стадии (i) самоопыления или скрещивания растения согласно варианту осуществления 22 и (ii) сбора семени, содержащего рекомбинантный полинуклеотид растения из стадии самоопыления или скрещивания, с получением тем самым семени растения, которое обеспечивает растения, устойчивые к заражению патогенным для растений микроорганизмом.

Цитируемые публикации

[108] Argos, (1990) *J Mol Biol.* Feb 20;211(4):943-58.

[109] Broadley, M.R., Bowen, H.C., Cotterill, H.L., Hammond, J.P., Meacham, M.C., Mead, A., and White, P.J. (2003). *Journal of Experimental Botany* 54, 1431-1446

[110] Buchko et al. (2018) *Protein Science* 27, 1611-1623.

[111] Chang et al. (2015) *Amino Acids* 47, 579-587.

- [112] Chen et al., (2013) *Adv Drug Deliv Rev.*; 65(10): 1357-1369.
- [113] da Silva Conceicao, A., and Broekaert, W.F. (1999). *Plant Defensins. B Pathogenesis-related proteins in plants*, S. Muthukrishnan, ed (New York: CRC Press), pp. 247-260.
- [114] Franqois et al., *Plant Physiology* (2002) 128: 1346-1358.
- [115] George RA, and Heringa (2002) *J Protein Eng.* 15(11):871-879.
- [116] Hanks, J.N., et al., (2005). *Plant Mol Biol* 58, 385-399.
- [117] Kerenga BK, et al., (2019) *Front. Microbiol.* 10:795. doi: 10.3389/fmicb.2019.00795
- [118] Kiedzierska, *et al.* (2008) *Protein Expr Purif* 60, 82-8.
- [119] Kingsman SM, et al., (1985) *Biotechnol Genet Eng Rev.* 3:377-416.
- [120] Kuddus et al. (2017). *Biotechnol Prog* 233:1520-1528. doi: 10.1002/btpr. Protein Science 2508.
- [121] Kumar, V. and Jain, M. (2015) *J Exp Bot* 66: 47-57.
- [122] Lacerda et al., *Frontiers in Microbio.* (2014) 5(116): 1-10.
- [123] Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2005) *Curr Protein Pept Sci* 6, 85-101.
- [124] Marques et al. (2008) *J Appl Microbiol* 106, 1640-1648.
- [125] Mottram et al., *FEBS Lett.* (1989) 258(2):211-215.
- [126] Murovec et al., *Plant Biotechnol J.* 2017 Aug; 15(8): 917-926.
- [127] Pazgier et al. (2006) *Protein Expr Pur* 49, 1-8.
- [128] Reiser J, et al., (1990) *Adv Biochem Eng Biotechnol.* ; 43:75-102.
- [129] Sagaram et al., (2011) *PLOS ONE* 6: e18550.
- [130] Sagaram et al., (2013) *PLoS ONE*, 8(12): e82485.
- [131] Shabala, S., and Pottosin, I.I. (2010) *Signal. Commun. Plants* 87-110.
- [132] Svitashv et al., (2015) *Plant Physiology*, 169 (2): 931-945.
- [133] Spelbrink, R.G., et al., (2004). *Plant Physiol* 135, 2055-2067.
- [134] Terras, F.R., et al., (1992). *J Biol Chem* 267, 15301-15309.
- [135] Thomma, B. P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). *Planta* 216, 193-202.
- [136] Turner et al., (1993) *Protein Eng.* 6(1): 101-108.
- [137] Voytas, D. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 64: 327-350, 2013.
- [138] Vasivarama and Kirti (2013a) *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 115:309-319.
- [139] Vasivarama and Kirti (2013b) *Funct Integr Genomics* 13:435-443.
- [140] Vriens, K., et al. *Molecules* 2014, 19, 12280-12303; doi: 10.3390/molecules190812280.
- [141] White, P., and Karley, A. (2010). *Potassium. B Cell Biology of Metals and Nutrients*; Hell, R., Mendel, R.R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany., 199-224

ПРИМЕРЫ

[142] Пример 1

- [143] Неочищенные пептиды (GMA4C-AC, GMA4C_V1, GMA4C_V2 и

GMA4C_V3) синтезировались химическим путем в компании Biomatik Inc, Канада, а GMA4C_V4 и GMA4C_V5 в компании Alan Scientific Inc. (США) и далее очищались с применением линейного градиента смеси ацетонитрил/вода в обращенно-фазовой C-18 HPLC (Agilent Technologies, США). Фракции HPLC лиофилизировали и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеаз. Концентрацию каждого пептида определяли с применением анализа ВСА, выполняемого в соответствии с протоколом производителя (Thermo-Fisher Scientific, США). Противогрибковую активность определяли в анализах на культуральной среде SFM. Культуральная среда SFM содержит K_2HPO_4 (2,5 мМ), $MgSO_4$ (50 мкМ), $CaCl_2$ (50 мкМ), $FeSO_4$ (5 мкМ), $CoCl_2$ (0,1 мкМ), $CuSO_4$ (0,1 мкМ), Na_2MoO_4 (2 мкМ), H_3BO_3 (0,5 мкМ), KI (0,1 мкМ), $ZnSO_4$ (0,5 мкМ), $MnSO_4$ (0,1 мкМ), глюкозу (10 г/литр), аспарагин (1 г/литр), метионин (20 мг/литр), миоинозитол (2 мг/литр), биотин (0,2 мг/литр), тиамин-HCL (1 мг/литр) и пиридоксин-HCL (0,2 мг/литр), pH 7,0.

Таблица 2. Противогрибковая активность пептидов

Пептид	SEQ ID NO.	<i>B. cinerea</i> MIC (мкМ)	<i>F. graminearum</i> MIC (мкМ)	<i>F. oxysporum</i> MIC (мкМ)	<i>P. capsici</i> MIC (мкМ)
GMA4C_AC ¹	2	1,5-3,0	3	6	1,5
GMA4C_V1A	3	1,5	3	6	3
GMA4C_V2A	4	3	3-6	-	-
GMA4C_V3A	5	1,5	3	-	-
GMA4C_V4 неамидированный	11	1,5	3	-	-
GMA4C_V5 неамидированный	12	1,5	3	-	-
GMA4C_V6A	13	0,75	1,5	-	-

¹ С-конец амидирован.

Таблица 3. Сравнение GMA4C дикого типа и вариантов пептидов

Название пептида	SEQ ID NO:	Значения MIC (мкМ) против <i>B. cinerea</i>	Значения MIC (мкМ) против <i>F. graminearum</i>	Толерантность к солям	Комментарии

GMA4C_AC	2	3	6	+	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V1A	3	1,5	3	++	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V2A	4	3	6	++	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V3A	4	3	3	++	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V4A	6	1,5	1,5	+++	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V5A	7	3	3	+	Химический синтез, амидированный
GMA4C_V6A	13	0,75	1,5	+++	Химический синтез, амидированный

[144] **Противогрибковая активность *in vitro* в условиях низкого содержания катионов.** Варианты GMA4C, GMA4C_V1A, GMA4C_V3A, GMA4C_V4A и GMA4C_V5A, проявляют противогрибковую активность *in vitro* против *B. cinerea*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* и *P. capsici*, которая эквивалентна контрольному GMA4C_AC дикого типа. Вариант GMA4C, GMA4C_V2A, проявляет двукратное снижение противогрибковой активности *in vitro* против *B. cinerea* и *F. graminearum* относительно контрольного GMA4C_AC дикого типа. GMA4C, GMA4C_V6A, проявляет четырехкратное повышение противогрибковой активности *in vitro* против *B. cinerea* относительно контрольного GMA4C_AC дикого типа.

[145] **Противогрибковая активность *in planta*.** При нанесении на отделенные листья *Nicotiana benthamiana* GMA4C_V1A и GMA4C_V3A более эффективны, чем GMA4C_AC или GMA4C_V2A, в снижении симптомов болезни серой гнили, вызванной *B. cinerea*, как показано на фиг. 1A и 1B. При нанесении на листья томатов GMA4C_V1A более эффективен в снижении симптомов болезни, вызванной *P. capsici*, чем GMA4C_AC.

[146] **Противогрибковая активность *in vitro* в присутствии катионов.** При тестировании на противогрибковую активность против *B. cinerea* в присутствии 100 мМ NaCl, 100 мМ KCl или 2 мМ CaCl₂ все пептиды, включая GMA4C_AC, сохраняли свою противогрибковую активность в присутствии 100 мМ NaCl или 100 мМ KCl. Однако GMA4C_V1A и GMA4C_V4A характеризуются в 2 раза более сильной активностью, чем GMA4C_AC. В присутствии 2 мМ CaCl₂ только GMA4C_V1A и GMA4C_V4A подавляют рост грибов при 6 мкМ, тогда как другие пептиды, такие как растительные дефензины

MtDef4 или OeDef1, демонстрируют незначительную или отсутствие активности при этой концентрации.

Таблица 4. GMA4C и его варианты сохраняют противогрибковую активность против *B. cinerea* в присутствии солей

Пептид	SEQ ID NO:	MIC SFM (мкМ) ¹	SFM+100 mM NaCl MIC (мкМ) ¹	SFM+100 mM KCl MIC (мкМ) ¹	SFM+2 mM CaCl ₂ MIC (мкМ) ¹
GMA4C_AC ¹	2	3	3	6	>6 (несколько проросших при 6)
GMA4C_V1A	3	3	1,5	3	6
GMA4C_V2A	4	6	3	6	>6
GMA4C_V3A	5	3	1,5-3	>6	>6
GMA4C_V4A	6	1,5-3	1,5	1,5	3-6
GMA4C_V4 неамидированный	11	3	3	3	6
GMA4C_V5A	7	6	6	>6	>6
GMA4C_V5 неамидированный	12	6	6	>6	>6 (очень чувствительный)
GMA4C_V6A	13	1,5	0,75-1,5	1,5-3	3-6

¹ Минимальная подавляющая концентрация (MIC) представляет собой концентрацию пептида, при которой отсутствует значимый рост микроорганизма относительно роста микроорганизма в ростовой среде, не содержащей соединения, белок или пептид. **Противогрибковая активность против грибковых патогенов человека.** GMA4C_V1A и GMA4C_V3A проявляют противогрибковую активность против *S. auris* и *S. glabrata* в среде RPMI, богатой катионами, однако исходный дефензин MtDef4 не проявляет активности.

Таблица 5. Композиция культуральной среды Roswell Park Memorial Institute 1640 (среда RPMI; с глутамином и феноловым красным, но без бикарбоната)

Компонент	Вода, г/л	Компонент	Вода, г/л
L-аргинин (свободное основание)	0,2	Биотин	0,0002

L-аспарагин (безводный)	0,05	D-пантотеновая кислота	0,00025
L-аспарагиновая кислота	0,02	Хлорид холина	0,003
L-цистин * 2HCl	0,0652	Фолиевая кислота	0,001
L-глутаминовая кислота	0,02	Миоинозитол	0,035
L-глутамин	0,3	Ниацинамид	0,001
Глицин	0,01	РАВА	0,001
L-гистидин (свободное основание)	0,015	Пиридоксин HCl	0,001
L-гидроксипролин	0,02	Рибофлавин	0,0002
L-изолейцин	0,05	Тиамин HCl	0,001
L-лейцин	0,05	Витамин B ₁₂	0,000005
L-лизин * HCl	0,04	Нитрат кальция H ₂ O	0,01
L-метионин	0,015	Хлорид калия	0,4
L-фенилаланин	0,015	Сульфат магния (безводный)	0,04884
L-пролин	0,02	Хлорид натрия	6
L-серин	0,03	Фосфат натрия, двухосновный (безводный)	0,8
L-треонин	0,02	D-глюкоза	2
L-триптофан	0,005	Глутатион, восстановленный	0,001
L-тирозин * 2Na	0,02883	Феноловый красный, Na	0,0053
L-валин	0,02		

Таблица 6. GMA4C_V1A и GMA4C_V3A проявляют противогрибковую активность in vitro в среде RPMI против *Candida auris* и *C. glabrata*

Пептид	<i>Candida albicans</i> MIC (мкг/мл) ¹	<i>Candida auris</i> MIC (мкг/мл) ¹	<i>Candida glabrata</i> MIC (мкг/мл) ¹
MtDef4	>46,9	46,9	>46,9
GMA4C_V1A	46,9	11,9	11,9
GMA4C_V3A	>46,9	23,9	23,9

¹ Минимальная подавляющая концентрация (MIC) представляет собой концентрацию белка или пептида, при которой отсутствует значимый рост микроорганизма относительно роста микроорганизма в ростовой среде, не содержащей соединения, белок или пептид.

[147] **Пример 2. Активность вариантов GMA4C против патогенных микроорганизмов**

[148] При тестировании противогрибковой активности использовали разбавленный вдвое картофельно-декстрозный бульон для пептидов и RPMI для сравнительных противогрибковых препаратов, флуконазола и вориконазола. Для измерения значений MIC использовали методики CLSI M27 и M38. Минимальная подавляющая концентрация (MIC) представляет собой концентрацию соединения, белка или пептида, при которой отсутствует значимый рост микроорганизма относительно роста микроорганизма в ростовой среде, не содержащей соединения, белок или пептид.

[149] Все тестирование проводили в среде RPMI, забуференной 0,165 М MOPS. Диапазон концентраций пептидов в картофельно-декстрозном бульоне составлял 0,06-2 мкг/мл, диапазон концентраций флуконазола составлял 0,125-64 мкг/мл, а диапазон концентраций вориконазола составлял 0,03-16 мкг/мл. MIC определяли через 24-72 часа.

Таблица 7. Формула картофельно-декстрозного бульона

Картофельно-декстрозный бульон	
Значение	Ингредиенты и условия
1000 мл	Вода
4 г (из 200 г вымоченного картофеля)	Клубни картофеля (нарезанные, не очищенные, вымытые)
20 г	Глюкоза
pH 5,6	Конечный pH
25 С	Температура

Таблица 8. Значения MIC для вариантов GMA4C. Полная таблица с данными для флуконазола и вориконазола представлена на фиг. 4

Вид (изолят)	№ изолята	GMA4C_V1A	GMA4C_V2A	GMA4C_V4A	GMA4C_V5A
		100%	100%	100%	100%
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	4	8	8	8
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	8	16	8	8
<i>P. variotii</i>	MYA-363	4	8	8	4
<i>Candida albicans</i>	SC5314	8	16	8	16
	ATCC 90028	8	16	8	16
	CA3	8	16	8	8

<i>Candida auris</i>	DI17-47	8	16	8	16
	DI17-48	8	16	8	16
	DI17-46	8	16	8	16
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF293	32	32	16	32
	DI15-106	>32	>32	16	>32
	DI15-116	>32	>32	32	>32
<i>Fusarium</i>	F1 (<i>F. oxysporum</i>)	4	8	8	8
	F2 (<i>F. oxysporum</i>)	4	16	8	16
	F4 (<i>F. solani</i>)	4	8	8	8
<i>Coccidioides</i> sp.	Cocci1	8	8	4	2
	Cocci2	4	16	16	16
	DI17-143	8	16	16	16

Таблица 9. Противогрибковая активность GMA4C дикого типа и его вариантов против грибковых патогенов растений в SFM

SEQ ID NO:	Пептид	Последовательность	MIC (мкМ) <i>Botrytis cinerea</i>	MIC (мкМ) <i>Fusarium graminearum</i>
2	GMA4C_AC	GGRCRGFRRRCFCTTHC-NH ₂	3	3
3	GMA4C_V1A	GGRCCKGFRRRCFCTRIC-NH ₂	3	3
4	GMA4C_V2A	GGRCRGFRRRCFCTRIC-NH ₂	6	3-6
5	GMA4C_V3A ¹	GGRCRGFRRRVFVTRIC-NH ₂	3	3
6	GMA4C_V4A	FGRCRGFRRRCFCWRWC-NH ₂	1,5	--
7	GMA4C_V5A ²	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC-NH ₂	6	--
8	GMA4AC	GRRCRGFRRRCFCTTHC	6	6
11	GMA4C_V4	FGRCRGFRRRCFCWRWC	3	3
12	GMA4C_V5 ²	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC	6	3

13	GMA4C_V6 ¹	GGRCKGFRRRWFWTRIC-NH ₂	0,75	1,5
14	GMA4C_V7	XGRCKGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)XXXC-(NH ₂)	--	--
15	GMA4C_V8	GGRCKGFRRRWYWTRIC-NH ₂	--	--

Таблица 10. Противогрибковая активность GMA4C дикого типа и его вариантов против грибковых патогенов растений в SFM+соли

Пептид (SEQ ID NO)	MIC SFM (мкМ)	SFM+100 мМ NaCl MIC (мкМ)	SFM+100 мМ KCl MIC (мкМ)	SFM+2 мМ CaCl ₂ MIC (мкМ)
GMA4C_AC (SEQ ID NO: 2)	3	3	6	>6 (несколько проросших при 6)
GMA4C_V1A (SEQ ID NO: 3)	3	1,5	3	6
GMA4C_V2A (SEQ ID NO: 4)	6	3	6	>6
GMA4C_V3A (SEQ ID NO: 5)	3	1,5-3	>6	>6
GMA4C_V4A (SEQ ID NO: 6)	1,5-3	1,5	1,5	3-6
GMA4C_V4 неамидированный (SEQ ID NO: 11)	3	3	3	6
GMA4C_V5A (SEQ ID NO: 7)	6	6	>6	>6
GMA4C_V5 неамидированный (SEQ ID NO: 12)	6	6	>6	>6 (очень чувствительный)
GMA4C_V6A (SEQ ID NO:13)	1,5	0,75-1,5	1,5-3	3-6

Таблица 11. Противогрибковая активность пептидов против дрожжевых патогенов человека в разбавленном вдвое картофельно-декстрозном бульоне

Пептид	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida auris</i>	<i>Candida glabrata</i>
--------	-------------------------	----------------------	-------------------------

	(33795)	(38883)	(38827)
	МИС (мкМ)	МИС (мкМ)	МИС (мкМ)
MtDef4 ¹	1,1	1,1	0,55
GMA4C_V1A (SEQ ID NO: 3)	11,2	11,2	11,2
GMA4C_V3A (SEQ ID NO: 5)	2,8	5,6	2,8

¹ Полноразмерный белок MtDef4 описан в патенте США № 7825297.

[150] Все изоляты патогенов, используемые в этом анализе, являются устойчивыми к противогрибковому препарату флуконазолу. Противогрибковые анализы проводили в разбавленном вдвое картофельно-декстрозном бульоне.

Таблица 12. Синергетические (или аддитивные) эффекты комбинации GMA4C_v3 или MtDef4/флуконазол

GMA4C_V3A (SEQ ID NO: 5)/флуконазол				
	МИС отдельно	МИС в комбинации	FICI ¹	Интерпретация
	мкг/мл (мкМ)	мкг/мл (мкМ)		
<i>C. albicans</i>	11,7/64 (4,2/206)	2,9/8 (1,4/25,8)	0,375	Синергетический
<i>C. glabrata</i>	11,7/64 (4,2/206)	5,9/8 (2,8/25,8)	0,625	Аддитивный
Полноразмерный белок MtDef4²/флуконазол				
	МИС отдельно	МИС в комбинации	FICI ¹	Интерпретация
	мкг/мл (мкМ)	мкг/мл (мкМ)		
<i>C. albicans</i>	5,9/64 (1,1/206)	2,9/2 (0,55/6,45)	0,53	Аддитивный
<i>C. glabrata</i>	2,9/64 (1,1/206)	1,5/64 (0,28/206)	1,5	Разница отсутствует
Заключение: GMA4C_v3 демонстрирует синергетическое усиление противогрибковой активности против устойчивого к лекарственному средству <i>C. albicans</i> в комбинации с флуконазолом.				

¹ FICI представляет собой индекс фракционной подавляющей концентрации. Его рассчитывают как $MIC_A \text{ комбинации} / MIC \text{ отдельно} + MIC_B \text{ комбинации} / MIC_B \text{ отдельно}$, где MIC_A комбинации представляет собой MIC средства А в комбинации, а MIC_A отдельно представляет собой MIC средства А отдельно. Средство А представляет собой пептид (GMA4C_V3A), а средство В представляет собой флуконазол в таблице сверху. Средство А представляет собой полноразмерный белок MtDef4, средство В представляет собой флуконазол в таблице снизу.

² Полноразмерный белок MtDef4 описан в патенте США № 7825297, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Таблица 13. Противогрибковая активность пептидов (MIC в мкМ) против патогенов ногтей человека (*Tricophyton spp.*) и аспергиллеза (*Aspergillus fumigatus*)

Пептид (SEQ ID NO:)	<i>Tricophyton rubrum</i> (23014)	<i>Tricophyton metagrophytes</i> (26103)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (36843)
MtDef4 ¹	2,2	1,1	>8,9
GMA4C_V1A (SEQ ID NO: 3)	11,2	11,2	22,4
GMA4C_V3A (SEQ ID NO: 5)	5,6	5,6	11,2
OeDef1 ²	3,8	3,8	>7,6
OeDef1_V3 (SEQ ID NO: 42)	4,0	4,0	>7,9

¹ Полноразмерный белок MtDef4 описан в патенте США № 7825297.

² Полноразмерный белок дефензина OeDef1 описан в WO 2020/146373.

Таблица 14. Противогрибковая активность варианта GMA4C (MIC в мкМ) против *Candida spp.* и аспергиллеза (*Aspergillus fumigatus*)

Вид	Изолят	GMA4C_V1A (SEQ ID NO: 3)	GMA4C_V2A (SEQ ID NO: 4)	GMA4C_V4 (SEQ ID NO: 11)	GMA4C_V5 (SEQ ID NO: 12)
<i>Candida albicans</i>	SC5314	3,8	7,6	3,8	7,6
	ATCC 90028	3,8	7,6	3,8	7,6
	CA3	3,8	7,6	3,8	3,8
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	1,9	3,8	3,8	3,8

<i>Candida auris</i>	DI17-47	3,8	7,6	3,8	7,6
	DI17-48	3,8	7,6	3,8	7,6
	DI17-46	3,8	7,6	3,8	7,6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF293	15,2	15,2	7,6	15,2
	DI15-106	>15,2	>15,2	7,6	>15,2
	DI15-116	>15,2	>15,2	15,2	>15,2
Fusarium	F1 (<i>F. oxysporum</i>)	3,8	3,8	3,8	3,8
	F2 (<i>F. oxysporum</i>)	3,8	7,6	3,8	7,6
	F4 (<i>F. solani</i>)	3,8	3,8	3,8	3,8
Coccidioides sp.	Cocci1	3,8	3,8	1,9	0,9
	Cocci2	1,9	7,6	7,6	7,6
	DI17-143	1,9	7,6	7,6	7,6

[151] **Пример 3. Антибактериальная активность GMA4C_V1A против бактериальных патогенов человека**

[152] Штаммы *Salmonella Typhimurium* var. Copenhagen, энтеротоксигенной *E. coli*-F4 и *Listeria monocytogens* (F5244) выращивали на протяжении ночи на планшете с агаром LB при 37°C. Небольшое число бактерий соскабливали с планшета, добавляли в среду Мюллера-Хинтона (МН) и выращивали до фазы логарифмического роста. Клетки разбавляли до $1-3 \times 10^6$ КОЕ/мл и добавляли по 50 мкл в каждую лунку полипропиленового 96-луночного планшета. Синтезированный пептид GMA4C_V1A разбавляли в 0,2% BSA, 0,01% растворе уксусной кислоты и добавляли в концентрации 0,2, 0,4, 0,80, 1,6, 3,25, 7,5, 15, 30, 60 и 120 мкМ. Затем 50 мкл раствора каждого пептида добавляли к 50 мкл бактериальных клеток. Планшеты покрывали парафильмом и инкубировали при 37°C на протяжении ночи. Концентрации, при которых рост бактерий подавлялся, определяли на основе значения OD₆₀₀ нм при каждой концентрации относительно значения OD₆₀₀ нм среды МН отдельно и значения роста бактерий в среде МН без какого-либо пептида.

Минимальная подавляющая концентрация (MIC) представляет собой концентрацию пептида, при которой отсутствует значимый рост микроорганизма относительно роста микроорганизма в ростовой среде, не содержащей пептид.

Таблица 15. Антибактериальная активность GMA4C_V1A (SEQ ID NO: 3)

Концентрации GMA4C_V1A (в мкМ), при которых наблюдали подавление роста каждого бактериального патогена			
Пептид	<i>S. typhimurium</i> var. Copenhagen	Энтеротоксигенная <i>E. coli</i> - F4	<i>L. monocytogenes</i> F5244
GMA4C_V1	15-60	7,5-60	15-30

[153] Пример 4. Противомикробная активность фрагментов пептида дефензина

[154] Неочищенные химически синтезированные пептиды-производные дефензина с чистотой 80-85% получали от компании Biomatik Inc, Канада, или от компании Alan Scientific Inc, США. Каждый пептид подвергали дополнительной очистке с применением обращенно-фазовой C-18 HPLC (Agilent, Сингапур). Фракции HPLC, содержащие пептид, лиофилизировали и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеаз. Концентрацию определяли с применением анализов ВСА с использованием протокола производителя (Thermo-Fisher Scientific) для их точного количественного определения.

[155] Каждый из штаммов грибов *Botrytis cinerea* T-4, *Alternaria alternata*, *Cercospora soja* и *Colletotrichum gloeosporioides* культивировали в их соответствующей нормальной ростовой среде, показанной в таблице 16. Споры грибов собирали, заливая планшеты для выращивания грибов стерильной водой. Суспензию спор фильтровали через два слоя Miracloth, центрифугировали при 13600 об./мин в течение 1 минуты, промывали и ресуспендировали в синтетической среде для грибов (SFM) с низким содержанием солей (патент США № 6316407). Суспензию спор доводили до требуемого количества спор с применением гемоцитометра.

Таблица 16

Штаммы	Среда для образования спор	Условия культивирования
<i>B. cinerea</i>	20% V8	7-25 дней, 25°C
<i>Alternaria alternata</i>	10% картофельно-декстрозный агар	7-15 дней, 25°C
<i>Cercospora soja</i>	20% V8	12 часов света/12 часов темноты при 25°C
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10% картофельно-декстрозный агар	7-15 дней, 25°C

[156] Противогрибковую активность усеченных пептидов-производных дефензина и их вариантов против грибковых патогенов *B. cinerea*, *A. alternata*, *C. soja* и *C.*

gloeosporioides определяли спектрофотометрически с применением анализа в 96-луночном планшете (Sagaram et al., (2011) PLoS ONE 6: e18550. doi:10,1371/journal.pone.0018550). Сорок пять микролитров пептида в концентрациях 0,375, 0,75, 1,5, 3, 12 мкМ добавляли в каждую лунку титрационного микропланшета, содержащего 45 мкл суспензии спор ($\sim 10^5$ спор *B. cinerea*/мл). Количественное подавление роста грибов определяли путем измерения поглощения при 595 нм с применением устройства для считывания микропланшетов (Tecan Infinite M200 Pro Tecan Systems Inc., Сан-Хосе, Калифорния) через 48 часов. Жизнеспособность грибных клеток определяли с применением анализа жизнеспособности клеток с использованием резазурина (Chadha and Kale, (2015) *Lett Appl Microbiol* 61, 238-244, Li et al., (2019) *Mol Plant Microbe Interact* 32, 1649-1664). После инкубации смеси патоген/пептид в течение 48 ч в каждую лунку добавляли 10 мкл 0,1% раствора резазурина и повторно инкубировали на протяжении ночи. Изменение цвета резазурина с голубого на розовый или обесцвечивание указывало на присутствие живых грибных клеток. Значение МИС каждого пептида определяли как минимальную концентрацию пептида, при которой не наблюдалось изменение синего цвета. Значения МИС пептидов-производных дефензина и их вариантов также определяли в SFM и SFM, дополненной 100 мМ NaCl, 100 мМ или 2 мМ CaCl₂, как описано выше.

[157] Противогрибковую активность каждого пептида-производного дефензина и его вариантов против *B. cinerea* определяли semi-in planta с применением отделенных листьев *N. benthamiana* Nb1, как описано ранее (Li et al., (2019) *Mol Plant Microbe Interact* 32, 1649-1664; Velivelli et al., (2020) *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117, 16043-16054). Каждый пептид тестировали в концентрациях 1,5 мкМ, 3 мкМ и 6 мкМ. После инкубации каждой смеси пептид/грибная спора при комнатной температуре в течение 48 ч листья фотографировали в белом свете. Флуоресцентные изображения высокого разрешения также получали с применением CropReporter (PhenoVation, Вагенинген, Нидерланды). На этих изображениях отражены рассчитанные значения F_V/F_M (максимальный квантовый выход фотосистемы II) пораженных болезнью областей, затронутых инфекцией *B. cinerea*. Цвета на изображениях показывают пять разных классов, находящихся в диапазоне от класса I до класса V (от 0,000 до 0,700), отражающих варьирующие степени повреждения тканей. Зеленый цвет на каждом изображении представляет класс V в диапазоне от 0,600 до $\geq 0,700$, отражающий здоровую область на поверхности листа. Напротив, красный цвет представляет класс I в диапазоне от 0,000 до 0,160 и отражает сильно поврежденную или пораженную поверхность листа.

[158] Первичные аминокислотные последовательности, длина, суммарный заряд и процент гидрофобных аминокислот в пептидах-производных дефензина представлены в таблице 17. Эти пептиды являются производными растительных дефензинов OeDef1, MtDef4, MsDef1 и MtDef5A. Аминокислотные замены в последовательности дикого типа каждого пептида осуществляли для увеличения суммарного заряда и гидрофобности. Кроме того, в определенные варианты вводили дисульфидную связь, чтобы сделать их псевдоциклическими. Пептиды, которые могут образовывать одну дисульфидную связь и

псевдоциклический пептид, отмечены знаком “+” в колонке “Дисульфидная связь” таблицы 17. Все пептиды также несут карбокси-концевую амидную группу.

Таблица 17. Аминокислотные последовательности, длина, суммарный заряд и % гидрофобных аминокислот пептидов-производных дефензина. Указано присутствие дисульфидной связи, где необходимо

Пептид	Последовательность (присутствие дисульфида)	SEQ ID NO	Длина	Суммарный заряд	% гидрофобных аминокислот
GMAOe1C (WT)	GACLKNRHSKHYG CYCYRHC Y-NH ₂	577	22	4,5	32
GMAOe1C_V3	GACLKNRHSKHYG WFWYRH CY-NH ₂ (дисульфид +)	578	22	4,5	41
GMAOe1C_V4	GACLKNRHSKHYG FFWYRHC Y-NH ₂ (дисульфид +)	579	22	4,5	41
GMA4AC	GRCRGFRRCFCTTHC-NH ₂	580			
GMA4C_V9	GGRCKGFLRRFWTRIC-NH ₂ (дисульфид +)	581	17	5	35
GMA4C_V10	GGRCKGFRRRWYWTRIC-NH ₂ (дисульфид +)	582	17	6	29
GMA1C_V1	SGRCRILRRCFCTKNC-NH ₂	583	16	4	25
GMA1C_V2	SGRCRILRWFWTKNC-NH ₂ (дисульфид +)	584	16	4	37
GMA1C_V3	SGRCRILRWYFTKNC-NH ₂ (дисульфид +)	585	16	4	37
GMA5CA_WT	GACHRQGFGFACFCYKCC- NH ₂	586	18	3,5	28
GMA5CA_V3	GACHRQGFGFAWFWYKCC- NH ₂ (дисульфид +)	19	18	3,5	39
GMA5CA_V4	GACHRQGFGFAFFYKCC-NH ₂ (дисульфид +)	20	18	3,5	39

[159] Определяли значение минимальной подавляющей концентрации (MIC) каждого пептида-производного дефензина и его вариантов (таблица 18). Была выдвинута гипотеза, что присутствие катионов значительно ослабляет электростатические

взаимодействия между положительно заряженным дефензином и отрицательно заряженными мембранами грибов (Chu et al., (2013) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 4050-4052). Поэтому авторы настоящего изобретения определяли противогрибковую активность каждого пептида против *B. cinerea* в среде SFM, дополненной 100 мМ NaCl, 100 мМ KCl или 2 мМ CaCl₂ (таблица 18).

Таблица 18. Значения MIC пептидов-производных дефензина против *Botrytis cinerea*

Пептид	SEQ ID NO	MIC (мкМ) SFM	MIC (мкМ) (SFM+ 100 мМ NaCl)	MIC (мкМ) (SFM+ 100 мМ KCl)	MIC (мкМ) (SFM+ 2 мМ CaCl ₂)
GMAOe1C_WT	577	3	3-6	6-12	>12
GMAOe1C_V3	578	1,5	2-3	6-12	3-6
GMAOe1C_V4	579	1,5	6	6-12	6-12
GMA4AC	580	3	ND ¹	ND	ND
GMA4C_V9	581	3	3	6-12	12
GMA4C_V10	582	3	3	3-6	3
GMA1C	35	>12	>12	>12	>12
GMA1C_V1	583	>6	>6	>12	--
GMA1C_V2	584	1,5-3	3	>12	3
GMA1C_V3	585	1,5	3	>12	6
GMA5CA_WT	586	6	>12	>12	>12
GMA5CA_V3	19	3	>12	>12	>12
GMA5CA_V4	20	3	>12	>12	>12

¹ ND означает "не определено".

[160] Значения MIC пептидов-производных дефензина также тестировали против *Alternaria alternata*, *Cercospora sojina* и *Colletotrichum gloeosporioides* (таблица 19).

Таблица 19. Противогрибковая активность противогрибковых пептидов *in vitro* против *Alternaria alternata*, *Cercospora sojina* и *Colletotrichum gloeosporioides*

Пептид	SEQ ID NO	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cercospora sojina</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
GMA4AC_WT	580	>12	>12	>12
GMA 4C_V9	581	>12	6	>12
GMA 4C_V10	582	>12	6	>12
GMA5CA_WT	586	6	12	>12
GMA5CA_V3	19	3	6	>12

GMA5CA_V4	20	3	6	>12
-----------	----	---	---	-----

[161] Противогрибковую активность пептидов GMA4C_V9, GMA4C_V10, GMAOe1C_WT, GMAOe1C_V3, GMAOe1C_V4, GMA1C_V1 и GMA1C_V2 против *B. cinerea* определяли *semi-in planta* с применением отделенных листьев *N. benthamiana*. Каждый пептид в концентрациях 1,5 мкМ, 3 мкМ и 6 мкМ наносили на листья в виде капель и сразу же на каждую каплю пептида наносили свежеприготовленный конидиальный инокулят. Через 48 ч после инокуляции листья оценивали на предмет ослабления симптомов серой гнили относительно контроля без пептида путем измерения размеров поражений. Оба пептида GMA4C_V9 и GMA4C_V10 эффективно снижают симптомы заболевания серой гнилью. Однако при низких концентрациях, составляющих 1,5 мкМ и 3 мкМ GMA4C_V10 более эффективен в снижении симптомов серой гнили, чем GMA4C_V9 (фиг. 5).

[162] Для тестирования противогрибковой активности GMAOe1C_WT, GMAOe1C_V1, GMAOe1C_V2 также проводили анализ капельной инокуляции. Результаты показали, что GMAOe1C_V1 и GMAOe1C_V2 в концентрации 3 и 6 мкМ полностью устраняли симптомы серой гнили, но GMAOe1C_WT был эффективен только при 6 мкМ. При концентрации, составляющей 1,5 мкМ, GMAOe1C_V3 более эффективен, чем GMAOe1C_V4 или GMAOe1C_WT (фиг. 6).

[163] Для тестирования противогрибковой активности GMA1C_V1 и GMA1C_V2 также проводили анализ капельной инокуляции (фиг. 6). GMA1C_V2 при 3 мкМ и 6 мкМ полностью устранял симптомы серой гнили. GMA1C_V1 не смог уменьшить симптомы заболевания при этих концентрациях. При концентрации, составляющей 1,5 мкМ, GMA1C_V2 более эффективен, чем GMA1C_V1 (фиг. 7).

[164] Приведенные выше результаты указывают на то, что панель модификаций (например, аминокислотных замен), введенных в эти усеченные пептиды-производные дефензина, обеспечивает более высокую противогрибковую активность, чем у усеченных пептидов дикого типа.

[165] Широта и объем настоящего изобретения не должны быть ограничены ни одним из описанных выше примеров.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность

(а) модифицированной гамма-коровой консенсусной последовательности GXСХ3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 50), GXСХ3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 587), GXСХ3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXСХ3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXСХ3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), GXСХ3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44), GXСХ3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 45), GXСХ3-10(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 46), GXСХ3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 47), GXСХ3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M) (SEQ ID NO: 48), GXСХ3-8(F/W/Y/L/V/I/M) (F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 49), GXСХ3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 51), или GXСХ3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M) (SEQ ID NO: 52), где пептид дополнительно содержит второй С-концевой цистеиновый остаток, расположенный со стороны С-конца относительно цистеинового остатка в модифицированной гамма-коровой консенсусной последовательности, и где пептид характеризуется суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере 3, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%; или

(b) под SEQ ID NO: 1, где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41; где необязательно указанный пептид содержит модифицированную гамма-коровую консенсусную последовательность GXСХ3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 33), GXСХ3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) (SEQ ID NO: 34), GXСХ3-8 (F/W/Y) (SEQ ID NO: 43), или GXСХ3-9(F/W/Y) (SEQ ID NO: 44); и/или где необязательно С-концевой цистеиновый остаток или С-концевой аминокислотный остаток амидирован.

2. Пептид по п. 1, где указанный пептид содержит (i) консервативные цистеиновые остатки С1 и С4, соответствующие N-концевому и С-концевому цистеинам эталонного С-концевого пептида дефензина, где аминокислотные остатки 16 и 18, соответствующие консервативным цистеиновым остаткам С2 и С3 эталонного С-концевого пептида дефензина, независимо замещены триптофаном, тирозином, фенилаланином, лейцином, валином, изолейцином или метионином; и где необязательно вариант пептида дефензина характеризуется суммарным положительным зарядом, составляющим по меньшей мере 3, и содержанием гидрофобных аминокислот по меньшей мере 18%; или (ii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 68%, 75%, 82% или 94% идентичностью последовательности по всей длине SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, 15, 17-20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 42, 578, 579, 581, 582, 584, или 585, где указанный пептид не содержит соответствующую полноразмерную последовательность пептида дефензина под SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40 или 41; и где необязательно пептид (i) или (ii) содержит дисульфидную связь между двумя цистеиновыми остатками.

3. Пептид по п. 1 или п. 2, где пептид содержит, состоит по сути или состоит из (i) 30 аминокислотных остатков или меньше; или (ii) 15, 16 или 17-30 аминокислотных остатков.

4. Композиция, содержащая пептид по п. 1 или п. 2 и приемлемые в сельскохозяйственной, фармацевтической или ветеринарной практике носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

5. Композиция по п. 4, где пептид обеспечен в концентрации от приблизительно 0,1, 0,5, 1,0 или 5 пг/мл до приблизительно 1, 5, 20, 50 или 100 мг/мл или в концентрации от приблизительно 0,1, 0,5, 1,0 или 5 пг/грамм до приблизительно 1, 5, 20, 50 или 100 мг/грамм, и где необязательно композиция содержит соль натрия в концентрации по меньшей мере 100 мМ и/или соль кальция в концентрации по меньшей мере 2 мМ.

6. Способ предупреждения или уменьшения повреждения урожая патогенным для растений микроорганизмом, включающий стадию приведения растения, семени растения или другой части указанного растения в контакт с эффективным количеством композиции по п. 4.

7. Способ по п. 6, где патогенный для растений микроорганизм представляет собой *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Verticillium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Botrytis sp.*, *Cercospora sp.*, *Phakopsora sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Pythium sp.*, *Phoma sp.*, *Leptosphaeria sp.*, *Gaeumannomyces sp.*, *Puccinia sp.*, *Septoria sp.*, *Penicillium sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Phomopsis sp.*, *Mycosphaerella sp.*, *Golovinomyces sp.*, *Erysiphe sp.*, *Albugo sp.*, *Setosphaeria sp.*, *Cochliobolus sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Diplodia sp.*, или *Stenocarpella sp.*

8. Медицинское устройство, содержащее устройство и композицию по п. 4, где устройство содержит по меньшей мере одну поверхность, которая сверху покрыта и/или пропитана композицией.

9. Медицинское устройство по п. 8, где указанное устройство представляет собой стент, катетер, контактную линзу, презерватив, пластырь или диафрагму.

10. Способ лечения, предупреждения или подавления микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции по п. 4.

11. Способ по п. 10, где указанное введение включает местное, энтеральное, парентеральное и/или внутривенное введение композиции.

12. Способ по п. 10, где субъектом является человек, домашний скот, домашняя птица, рыба или животное-компаньон.

13. Способ по п. 10, где микробная инфекция поражает слизистую оболочку, глаз, кожу и/или ноготь, и композицию наносят на слизистую оболочку, глаз, кожу и/или ноготь.

14. Способ по п. 10, где микробная инфекция вызвана дерматофитом, и где дерматофит необязательно выбран из группы, состоящей из *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton*

soudanense, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium flavum*, *Epidermophyton floccosum*, и *Microsporium gypseum*.

15. Способ по п. 10, где микробная инфекция вызвана видом *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Saksenaea*, *Rhizomucor*, *Syncephalostrum*, *Cokeromyces*, *Actinomucor*, *Pythium*, *Fusarium*, *Histoplasmosis*, или *Blastomyces*.

16. Способ по п. 10, где микробная инфекция вызвана видом *Candida*, и где вид *Candida* представляет собой *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parasilosis*, *C. tropicalis*, или *C. krusei*.

17. Композиция по п. 4 для применения в способе лечения, предупреждения или подавления микробной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом.

18. Композиция по п. 17, где субъектом является человек, домашний скот, домашняя птица, рыба или животное-компаньон.

19. Часть растения, которая по меньшей мере частично покрыта композицией по п. 4.

20. Часть растения по п. 17, где часть представляет собой семя, и семя необязательно представляет собой семя кукурузы, сои, пшеницы, риса, хлопчатника, *Brassica* sp. или томата.

21. Часть растения по п. 19, где часть растения представляет собой фрукт, овощ или цветок.

22. Рекомбинантный полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, кодирующий пептид, содержащий пептид по п. 1 или п. 2, где полинуклеотид, кодирующий первый противомикробный пептид, функционально связан с полинуклеотидом, содержащим промотор, который является гетерологичным по отношению к полинуклеотиду, кодирующему первый противомикробный пептид, где необязательно любая аминокислотная замена в указанной последовательности увеличивает или сохраняет суммарный положительный заряд и/или увеличивает или сохраняет гидрофобность пептида.

23. Рекомбинантный полинуклеотид по п. 22, где рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий (i) транзитный пептид, нацеливающий на вакуоли пептид и/или нацеливающий на эндоплазматический ретикулум пептид; (ii) нацеливающий на пластиды пептид; и/или (iii) сигнал полиаденилирования или терминации транскрипции, где полинуклеотиды (i), (ii) и/или (iii) функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим противомикробный пептид.

24. Рекомбинантный полинуклеотид по п. 22, где полинуклеотид, кодирующий первый противомикробный пептид, вставлен в гетерологичный ядерный или пластидный геном клетки и функционально связан с эндогенным промотором, расположенным в гетерологичном ядерном или пластидном геноме.

25. Ядерный или пластидный геном растения, содержащий полинуклеотид,

кодирующий пептид, содержащий пептид по п. 1 или п. 2, где полинуклеотид является гетерологичным по отношению к ядерному или пластидному геному, и где полинуклеотид функционально связан с эндогенным промотором ядерного или пластидного генома.

26. Клетка, содержащая рекомбинантный полинуклеотид по п. 22, где клетка необязательно представляет собой бактериальную, дрожжевую или растительную клетку.

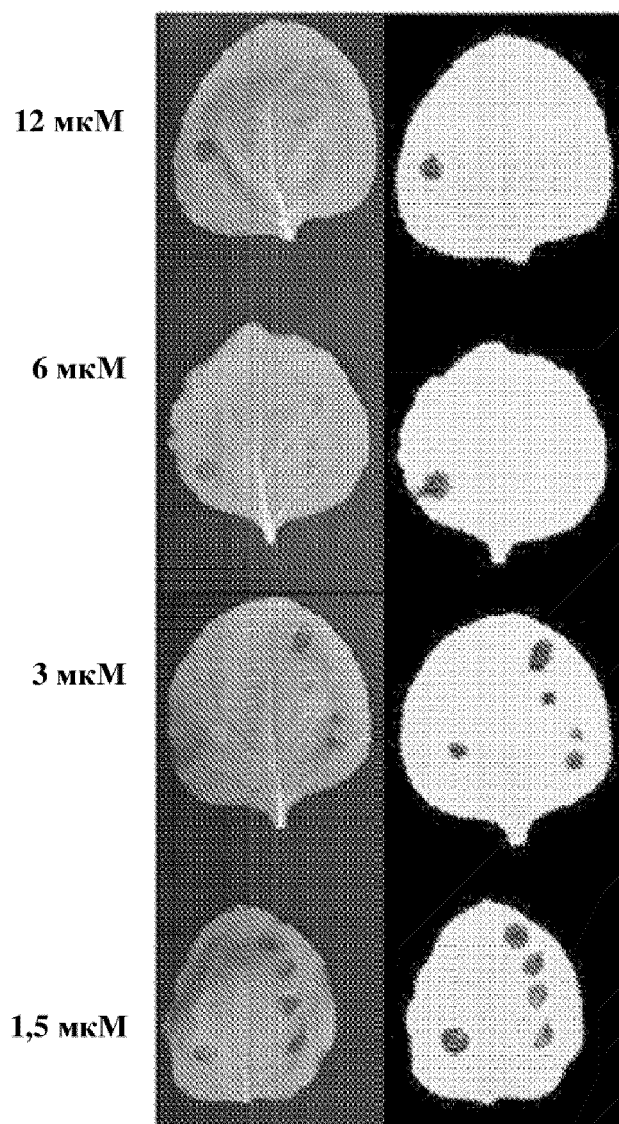
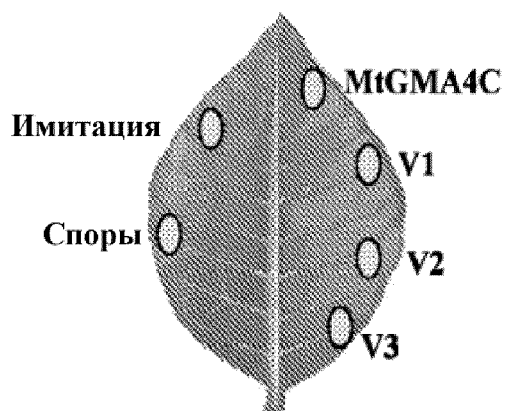
27. Растение, содержащее рекомбинантный полинуклеотид по п. 22.

28. Часть растения из растения по п. 27, где часть растения содержит рекомбинантный полинуклеотид, где необязательно часть растения представляет собой семя, стебель, лист, корень, клубень, цветок или плод.

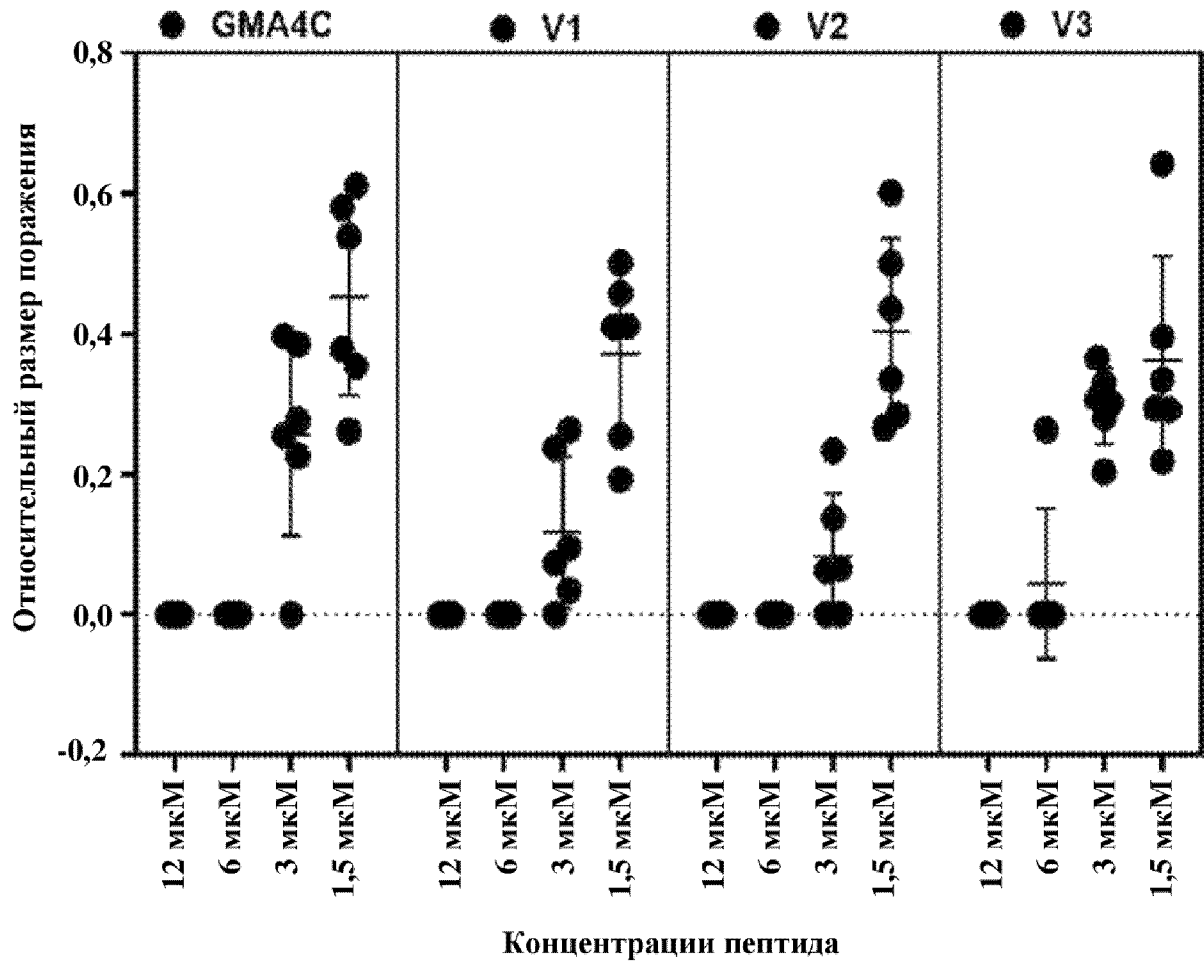
29. Способ получения семени растения, которое обеспечивает растения, устойчивые к заражению патогенным для растений микроорганизмом, который включает стадии (i) самоопыления или скрещивания растения по п. 27 и (ii) сбора семени, содержащего рекомбинантный полинуклеотид растения из стадии самоопыления или скрещивания, с получением тем самым семени растения, которое обеспечивает растения, устойчивые к заражению патогенным для растений микроорганизмом.

По доверенности

Схема для инокуляции



Фиг. 1А



Фиг. 1В

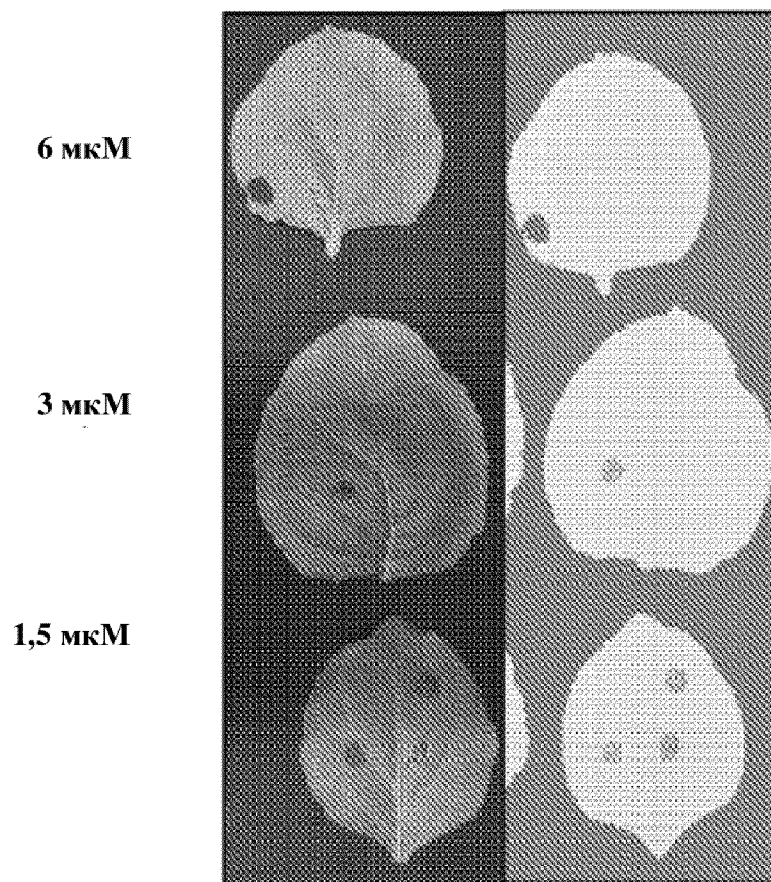
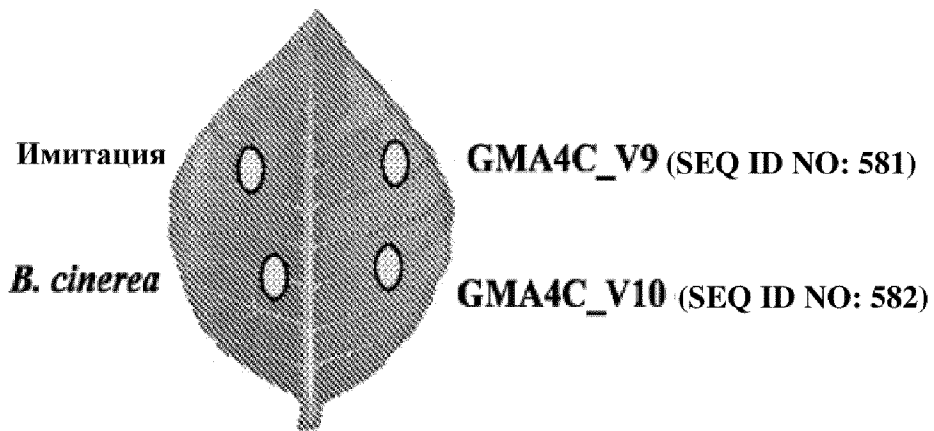
Источник	Название	Последовательность пептида				SEQ ID NO
		C1	C2	C3	C4	
<i>Medicago sativa</i>	MsDef1	<u>GRCR</u> DDER----- <u>CWCT</u> KN-C				35
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef4	<u>GRCRG</u> FRRR---- <u>CFCT</u> TH-C				8
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef5A	<u>GACHRQ</u> GFGFA-- <u>CFCY</u> KK-C				16
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef5B	<u>GACHRQ</u> GIGFA-- <u>CFCK</u> KK-C				41
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef6	<u>GRCRG</u> FRRR---- <u>CFCT</u> RP-C				21
<i>Olea europaea</i>	OeDef1	<u>GACLKNR</u> HSKHYGCYCYRHCY				24
<i>Olea europaea</i>	OeDef7	<u>GLCRG</u> FRRR--- <u>CFCT</u> KH-C				27
<i>Sorghum bicolor</i>	SbDef1	<u>GYCSS</u> RRQI---- <u>CKCT</u> LQ-C				30
<i>Nicotiana alata</i>	NaD1	<u>GHCSK</u> ILRR---- <u>CLCT</u> KP-C				37
<i>Raphanus sativum</i>	RsAFP2	<u>GSCNY</u> VFP AHK-- <u>CICY</u> FP-C				38
<i>Dahlia merckii</i>	DmAMP1	<u>GACHV</u> RNGKHM-- <u>CFCY</u> FN-C				39
<i>Heuchera sanguinea</i>	HsAFP1	<u>GACHYQ</u> FPSVK-- <u>CFCT</u> QN-C				40

Источник	Название	Последовательность пептида				SEQ ID NO
		C1	C2	C3	C4	
<i>Medicago sativa</i>	MsDef1	<u>GRCRDDFR</u> -----	<u>CWCTKN</u> -C			35
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef4	<u>GRCRGFRRR</u> ----	<u>CFCTTH</u> -C			8
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef5A	<u>GACHRQGF</u> GFA--	<u>CFCYKK</u> -C			16
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef5B	<u>GACHRQGI</u> GFA--	<u>CFCKKK</u> -C			41
<i>Medicago truncatula</i>	MtDef6	<u>GRCRGFRRR</u> ----	<u>CFCTRP</u> -C			21
<i>Olea europaea</i>	OeDef1	<u>GACLKNRHSKHYGCYCYRHCY</u>				24
<i>Olea europaea</i>	OeDef7	<u>GLCRGFRRR</u> ----	<u>CFCTKH</u> -C			27
<i>Sorghum bicolor</i>	SbDef1	<u>GYCSSRROI</u> ----	<u>CKCTLQ</u> -C			30
<i>Nicotiana alata</i>	NaD1	<u>GHCSKILRR</u> ----	<u>CLCTKP</u> -C			37
<i>Raphanus sativum</i>	RsAFP2	<u>GSCNYVFP</u> PAHK--	<u>CICYFP</u> -C			38
<i>Dahlia merckii</i>	DmAMP1	<u>GACHVRNGKHM</u> --	<u>CFCYFN</u> -C			39
<i>Heuchera sanguinea</i>	HsAFP1	<u>GACHYQFP</u> SVK--	<u>CFCTQN</u> -C			40
<i>Malus baccata</i>		<u>GKCSLLTRT</u> ----	<u>CMCTKK</u> -C			94
<i>Triticum dicoccoides</i>		<u>GKCDHRR</u> -----	<u>CVCTKG</u> -C			96
<i>Pyrus sp. cross</i>		<u>GHCSVLTRA</u> ----	<u>CVCTKK</u> -C			97
<i>Sesamum indicum</i>		<u>GSCKGFLLR</u> ----	<u>CICFKD</u> -C			104
<i>Vanilla planifolia</i>		<u>GHCSRREQHKIF</u>	<u>CIC</u>			108
<i>Brachypodium distachyon</i>		<u>GNCDGAVRR</u> ----	<u>CKCSRE</u> -C			112
<i>Setaria italica</i>		<u>GFCKGFFHRE</u> ---	<u>CMCTKD</u> -C			121
<i>Setaria italica</i>		<u>GECRFHGGLLR</u> -	<u>CFCNKL</u> -C			122
Гамма-коровая консенсусная последовательность 1		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> -C				9
Гамма-коровая консенсусная последовательность 2		<u>GXCXXXXXXXXXXXC</u>				10
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 5		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> --X				45
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 6		<u>GXCXXXXXXXXXX</u>				46
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 1		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> --XXX				33
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 2		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> -XXX				34
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 11		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> --XXX				51
Мод. гамма-коровая консенсусная последовательность 12		<u>GXCXXXXXXXXXX</u> XXX				52

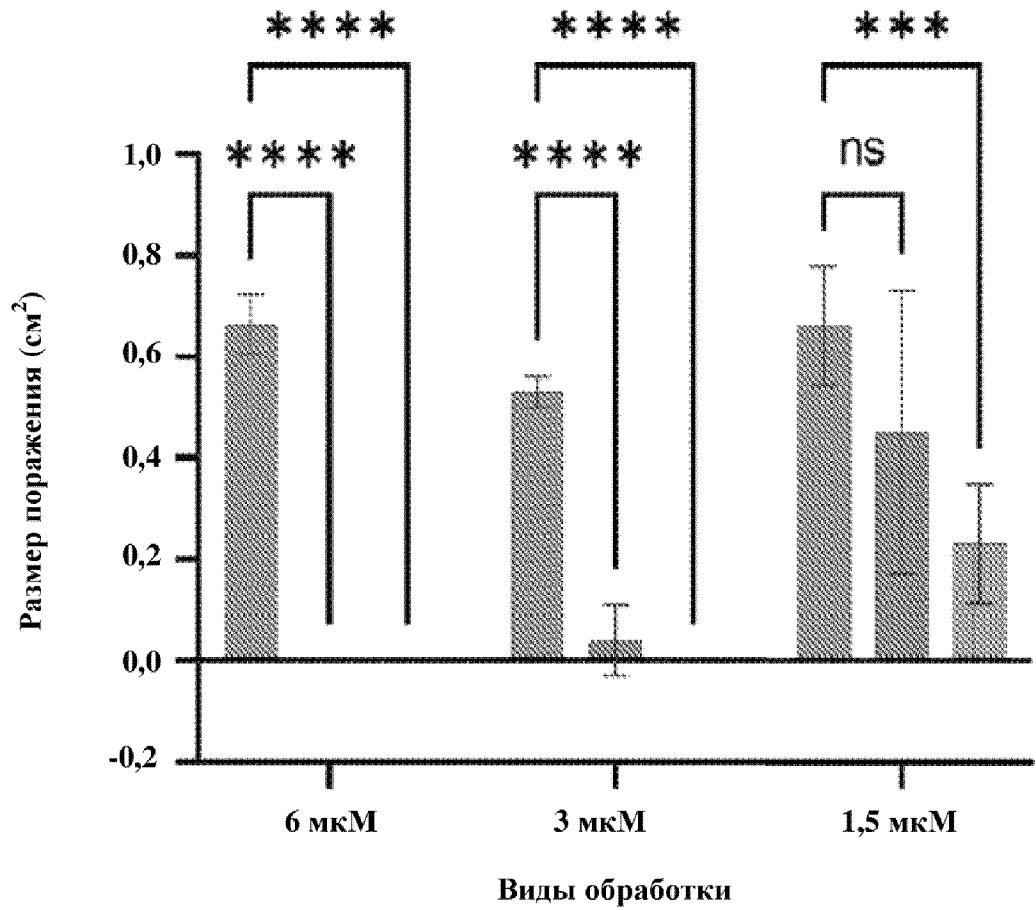
Фиг. 3




Вид (изолят)	№ изолята	GMA4C_V1A	GMA4C_V2A	GMA4C_V4A	GMA4C_V5A	Флуконазол	Вориконазол	Флуконазол	Вориконазол
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	4	8	8	8	2	---	4	---
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	8	16	8	8	64	---	64	---
<i>P. variotii</i>	MYA-363	4	8	8	4	16	0,125	16	0,125
<i>Candida albicans</i>	SC5314	8	16	8	16	>64	---	>64	---
	ATCC 90028	8	16	8	16	4	---	>64	---
	CA3	8	16	8	8	1	---	>64	---
<i>Candida auris</i>	DI17-47	8	16	8	16	>64	---	>64	---
	DI17-48	8	16	8	16	8	---	>64	---
	DI17-46	8	16	8	16	>64	---	>64	---
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF293	32	32	16	32	---	0,5	---	0,5
	DI15-106	>32	>32	16	>32	---	>16	---	>16
	DI15-116	>32	>32	32	>32	---	4	---	4
<i>Fusarium</i>	F1 (<i>F. oxysporum</i>)	4	8	8	8	---	4	---	8
	F2 (<i>F. oxysporum</i>)	4	16	8	16	---	4	---	2
	F4 (<i>F. solani</i>)	4	8	8	8	---	>16	-	>16
<i>Coccidioides</i> sp.	Cocci1	8	8	4	2	16	---	16	---
	Cocci2	4	16	16	16	64	---	>64	---
	DI17-143	8	16	16	16	16	---	>64	---

Фиг. 4

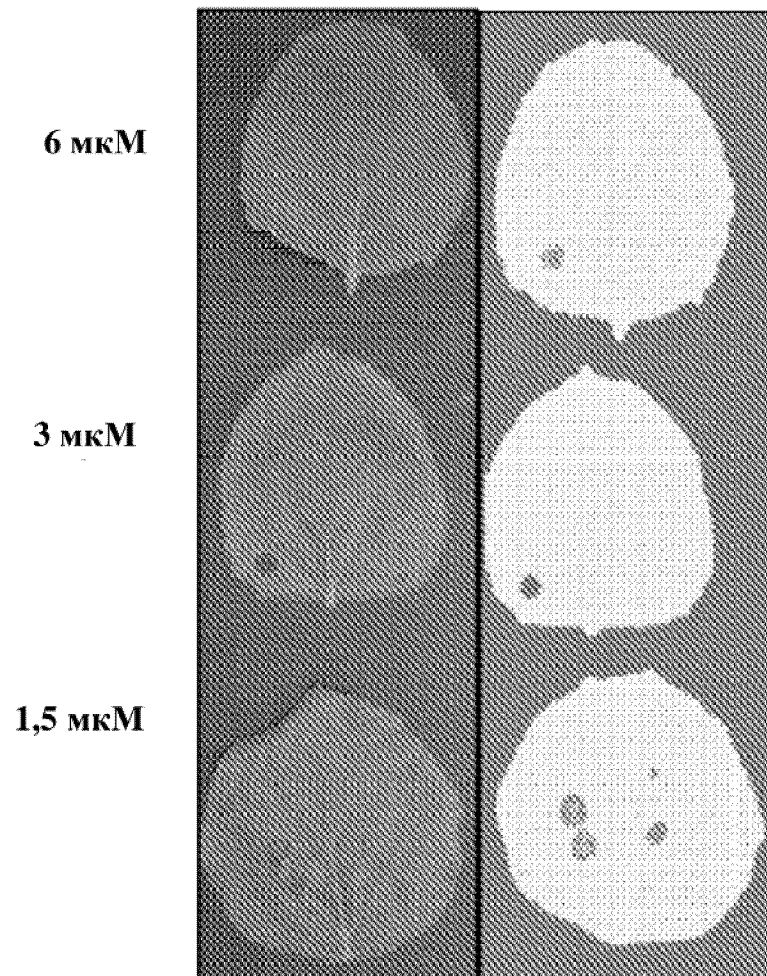
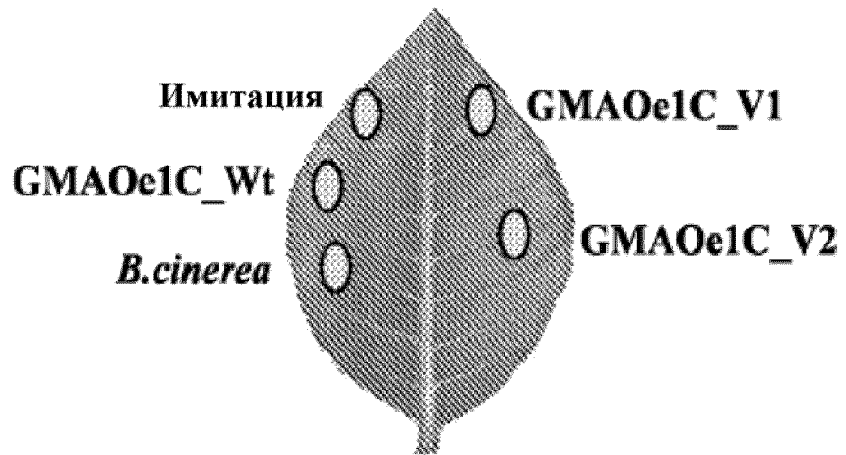


Фиг. 5А

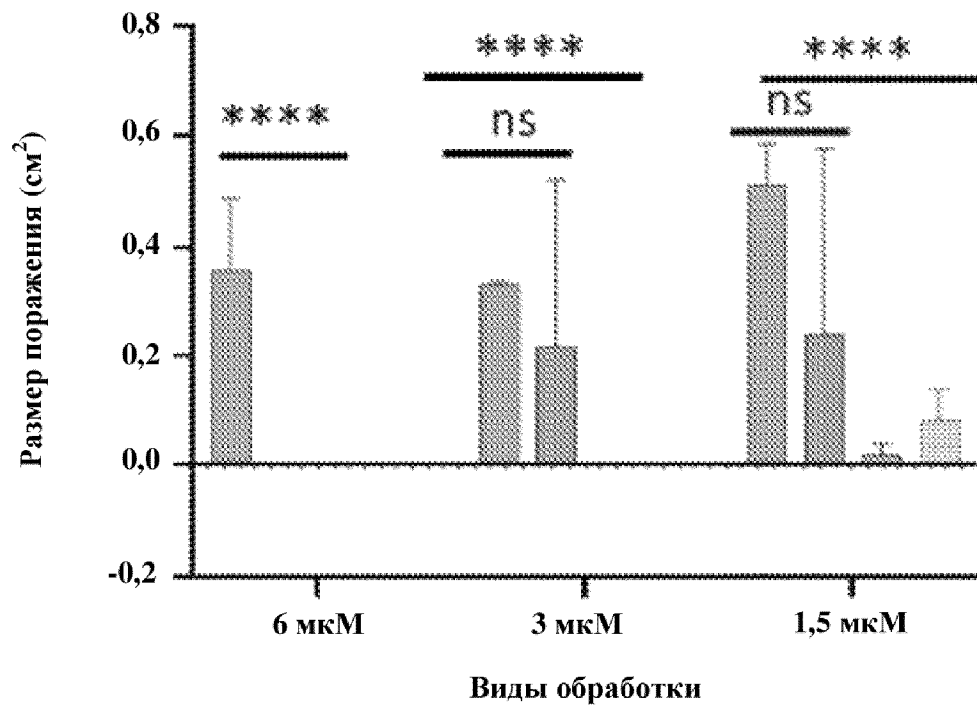






-  *B. cinerea*
-  GMA4C_V9 (SEQ ID NO: 581)
-  GMA4C_V10 (SEQ ID NO: 582)

Фиг. 5В

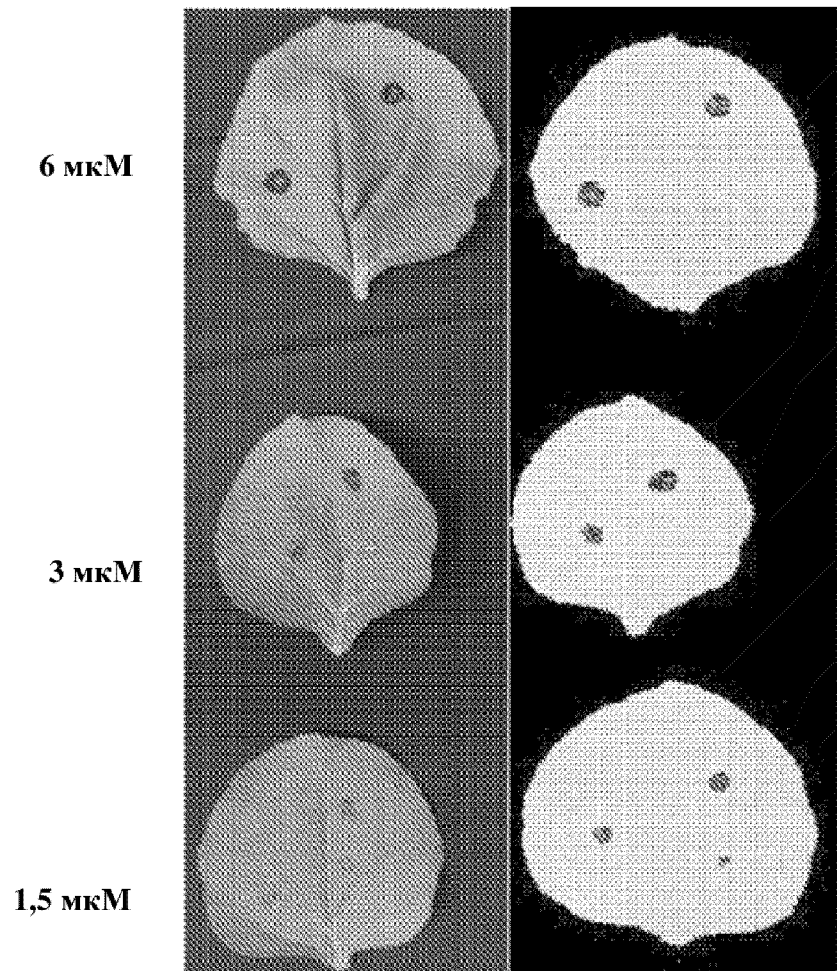
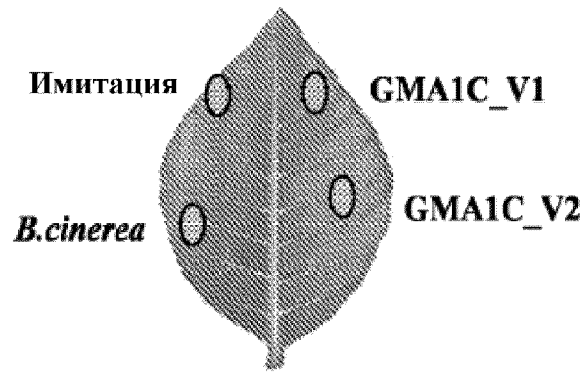


Фиг. 6А

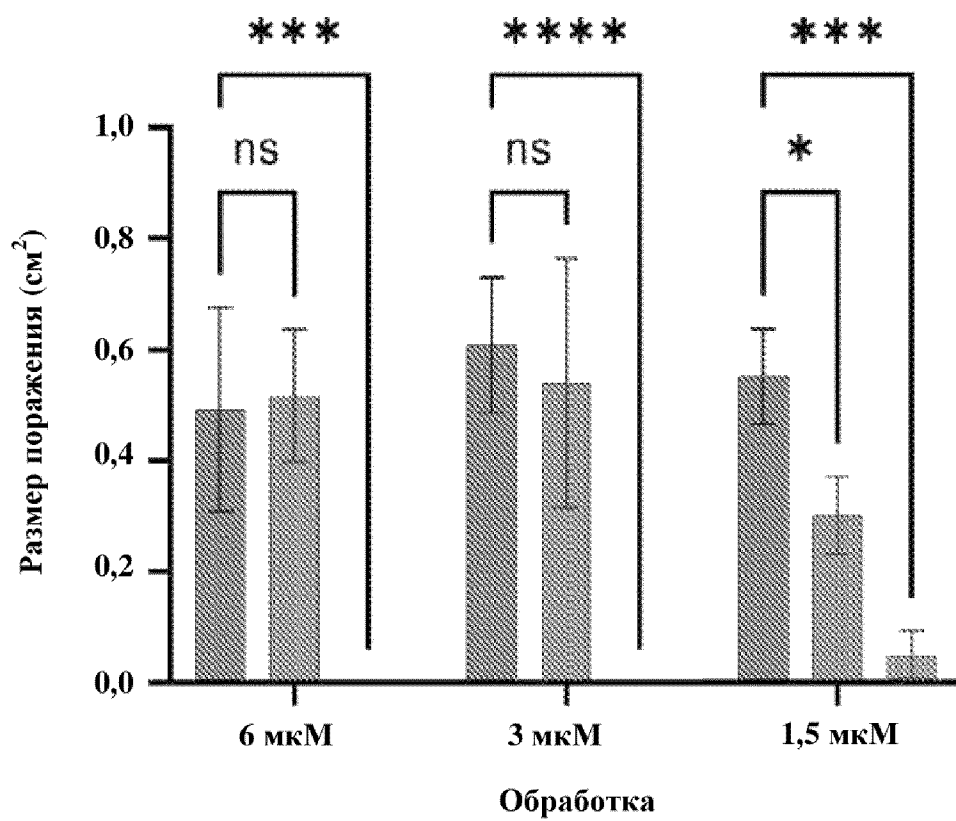





-  ***B. cinerea***
-  **GMAOe1C_WT**
-  **GMAOe1C_V1**
-  **GMAOe1C_V2**

Фиг. 6В



Фиг. 7А



-  *B. cinerea*
-  GMA41C_V1
-  GMA41C_V2