

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393248 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.01.24

(51) Int. Cl. *H02J 7/00* (2006.01)  
*G06Q 10/08* (2023.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.20

---

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ КОНТРОЛЯ НАСЕКОМЫХ

---

(31) 63/191,516

(72) Изобретатель:

(32) 2021.05.21

Флеминг Кристофер (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2022/030188

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(87) WO 2022/246153 2022.11.24

(71) Заявитель:

СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ  
(CH)

(57) Раскрыты новые пестицидные полипептиды, которые являются активными против насекомых-вредителей, относящихся к чешуекрылым. Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие новые инсектицидные белки. Нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные полипептиды, могут быть использованы для трансформации прокариотических и эукариотических организмов с целью экспрессии инсектицидных белков. Также раскрыты способы получения инсектицидных белков и способы применения инсектицидных белков, например, в трансгенных растениях для обеспечения защиты от вреда, наносимого насекомыми.

202393248

A1

A1

202393248

## КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ КОНТРОЛЯ НАСЕКОМЫХ

### 5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/191516, поданной 21 мая 2021 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### 10 ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДАЧЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей в текстовом формате ASCII, предоставленный в соответствии с 37 C.F.R. § 1.821, под названием “82392-sequencelisting\_ST25”, размером приблизительно 60 килобайт, созданный 22 апреля 2022 г. и поданный с помощью EFS-Web, представлен вместо бумажной копии. Данный перечень  
15 последовательностей включен с помощью ссылки в описание данного документа для его раскрытия.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к пестицидным белкам и молекулам  
20 нуклеиновой кислоты, которые их кодируют, а также к композициям и способам для контроля значимых для сельского хозяйства вредителей культурных растения.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) является грамположительной спорообразующей  
25 почвенной бактерией, которая отличается своей способностью продуцировать кристаллические включения, которые особенно токсичны для определенных отрядов и видов вредителей растений, в том числе насекомых, но безвредны для растений и других нецелевых организмов. По этой причине композиции, содержащие штаммы *Bacillus thuringiensis* или их инсектицидные белки, могут применяться в качестве  
30 экологически приемлемых инсектицидов для контроля значимых для сельского хозяйства насекомых-вредителей или насекомых-переносчиков различных заболеваний человека или животных.

Кристаллические (Cry) белки из *Bt* обладают потенциальной инсектицидной активностью в отношении преимущественно насекомых-вредителей, относящихся к

чешуекрылым, двукрылым и жесткокрылым. Эти белки также продемонстрировали активность в отношении вредителей из отрядов Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga и вредителей из отрядов подкласса Acari, а также других групп беспозвоночных, таких как Nematelminthes, Platyhelminthes и Sarcomastigophora (Feitelson, J. 1993. The Bacillus Thuringiensis Family Tree. In Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

Термины “токсин Cry” и “дельта-эндотоксин” применялись взаимозаменяемо с термином “белок Cry”. Современная номенклатура белков и генов Cry основана на гомологии аминокислотных последовательностей, а не на специфичности в отношении целевых насекомых (Crickmore *et al.* (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). В этой более распространенной классификации каждому токсину присваивается уникальное название, включающее первичный ранг (арабская цифра), вторичный ранг (заглавная буква), третичный ранг (строчная буква) и четвертичный ранг (еще одна арабская цифра).

Белки Cry представляют собой молекулы глобулярного белка, которые накапливаются в виде протоксинов в кристаллической форме в ходе стадии спорообразования *Bt*. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, можно предположить, что после проглатывания вредителем кристаллы обычно солюбилизируются, высвобождая протоксины, и высвобожденные протоксины обрабатываются протеазами в кишечнике насекомого, например, трипсином и химотрипсином, с образованием устойчивого к протеазам токсина корового белка Cry. Данный протеолитический процессинг включает удаление аминокислот из разных участков различных протоксинов Cry.

Части токсина белков Cry обычно содержат 5 блоков с консервативной последовательностью и три домена с консервативной структурой (см., например, deMaagd *et al.* (2001) Trends Genetics 17:193-199). Первый домен с консервативной структурой, называемый доменом I, как правило, состоит из семи альфа-спиралей и вовлечен во вставку в мембрану и образование пор. Домен II, как правило, состоит из трех бета-складчатых слоев, расположенных в конфигурации типа греческий ключ, а домен III, как правило, состоит из двух антипараллельных бета-складчатых слоев в виде структуры “jelly-roll” (deMaagd *et al.*, 2001, выше). Домены II и III вовлечены в распознавание и связывание рецепторов, и поэтому считаются детерминантами специфичности токсина. Карбоксиконцевая (C-концевая) часть белка, известная как протоксиновый сегмент, стабилизирует образование кристаллов.

Тщательный отбор и пересборка протоксинового сегмента и токсиновых доменов I, II и III любых двух или более токсинов, отличающихся друг от друга, применимы при поиске эффективных инсектицидных химерных белков, обладающих специфичностями, отличными от их родительских молекул. Из уровня техники известно, что в результате такой пересборки часто получают белки, демонстрирующие неправильное образование кристаллов или полное отсутствие выявляемой инсектицидной активности в отношении целевых видов насекомых. Это является следствием сложной природы структуры белка, олигомеризации и активации, необходимых для продуцирования инсектицидного химерного белка.

Многочисленные коммерчески ценные растения, в том числе широко распространенные сельскохозяйственные культуры, восприимчивы к нападению вредителей растений, в том числе насекомых-вредителей и нематод-вредителей, что приводит к существенным показателям снижения урожайности и качества сельскохозяйственных культур. Например, вредители растений являются главным фактором потери урожая важных мировых сельскохозяйственных культур. Насекомые-вредители также становятся бременем для овощеводов и плодоводов, производителей декоративных цветов, а также владельцев приусадебных хозяйств.

Насекомых-вредителей контролируют главным образом путем интенсивного применения химических пестицидов, которые действуют путем подавления роста насекомых, препятствования кормлению или размножению, или вызывая гибель. Средства для биологического контроля вредителей, например, штаммы *Bacillus thuringiensis*, экспрессирующие пестицидные токсины, такие как белки Cry, также применялись в отношении культурных растений с удовлетворительными результатами, что является альтернативой или дополнением к химическим пестицидам. Были выделены гены, кодирующие некоторые из этих белков Cry, и было показано, что их экспрессия в гетерологичных хозяевах, таких как трансгенные растения, обеспечивает еще один инструмент для контроля экономически важных насекомых-вредителей.

Таким образом, можно достичь хорошего контроля насекомых, однако некоторые биологические средства имеют очень узкий спектр активности, и продолжительное применение определенных способов биологического контроля повышает вероятность развития у насекомых-вредителей устойчивости к таким мерам контроля. Эта проблема частично решается с помощью различных методик контроля устойчивости, таких как убежища, однако остается необходимость в разработке новых эффективных способов контроля насекомых-вредителей с использованием

инсектицидных средств для контроля, которые могут быть направлены на более широкий спектр экономически значимых насекомых-вредителей и/или могут иметь иной способ действия, чем существующие инсектицидные белки. Обеспечение отличного способа действия должно обеспечить эффективный контроль насекомых-вредителей, которые являются устойчивыми или могут стать устойчивыми к существующим продуктам. Кроме того, эти способы контроля должны обеспечивать экономическую выгоду для фермеров и минимизировать нагрузку на окружающую среду.

10

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые являются инсектицидными против по меньшей мере вредителя, относящегося к чешуекрылым, например, против кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*), и к применениям таких полипептидов и связанных с ними нуклеиновых кислот в композициях и способах, например, на растениях и в способах контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым.

15

Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 96% (например, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) идентична SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит домен I, происходящий из белка CgylB (например, белка, подобного CgylBe), домен II, происходящий из белка CgylB, и домен III, происходящий из белка CgylC (например, белка CgylCa). В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит С-концевой хвост из белка CgylB. В некоторых вариантах осуществления полипептид является инсектицидным против вредителя, относящегося к чешуекрылым. В некоторых вариантах осуществления полипептид является инсектицидным против одного или нескольких из кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), огневки кукурузной (ECB; *Ostrinia nubilalis*), соевой совки (SBL; *Pseudoplusia includens*), совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), табачной листовертки (TBW; *Heliothis virescens*), азиатского кукурузного мотылька (ACB, *Ostrinia furnacalis*), совки восточной луговой (*Mythimna separata*, OAW), чайной

20

25

30

совки (TAW, *Athetis lepigone*), огневки желтой рисовой (SSB, *Chilo suppressalis*) и розовой стеблевой совки (PSB, *Sesamia inferens*).

В других аспектах настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей кодирующую последовательность, которая кодирует полипептид любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) идентична любой под SEQ ID NO:4-9 или содержит любую из них. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии в растении. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность функционально связана с гетерологичным промотором. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный промотор представляет собой неактивный в пыльце промотор.

В других аспектах настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе.

В других аспектах настоящее изобретение относится к трансгенной клетке-хозяину, содержащей полипептид любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе или нуклеиновую кислоту любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе. В некоторых вариантах осуществления трансгенная клетка-хозяин представляет собой растительную клетку. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку маиса. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку сои. В некоторых вариантах осуществления трансгенная клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку. В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка представляет собой клетку *Agrobacterium*, *Bacillus* или *Escherichia coli*.

В других аспектах настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полипептид любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого

другого варианта осуществления в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

5 В других аспектах настоящее изобретение относится к растению, содержащему полипептид любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе или нуклеиновую кислоту любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе. В некоторых вариантах осуществления растение является однодольным. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение маиса. В некоторых вариантах осуществления растение является двудольным. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение сои.

15 В других аспектах настоящее изобретение относится к семени растения любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе.

20 В других аспектах настоящее изобретение относится к товарному продукту, полученному из растения любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе, необязательно при этом товарный продукт представляет собой зерно, крахмал, масло из семян, патоку, муку тонкого помола, муку грубого помола, крахмал, крупу или белок.

25 В других аспектах настоящее изобретение относится к способу получения трансгенного растения, при этом способ включает а) введение в растительную клетку нуклеиновой кислоты любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе; б) отбор растительной клетки, содержащей нуклеиновую кислоту; и с) регенерацию растения из отобранной растительной клетки.

30 В других аспектах настоящее изобретение относится к способу получения трансгенного растения, при этом способ включает скрещивание первого растения, содержащего нуклеиновую кислоту любого из упомянутых выше вариантов осуществления или любого другого варианта осуществления в данном документе, со вторым растением с получением тем самым трансгенного растения.

В других аспектах настоящее изобретение относится к способу контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым, включающего доставку в организм вредителя полипептида любого из упомянутых выше вариантов осуществления или

любого другого варианта осуществления в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид доставляют путем скармливания. В некоторых вариантах осуществления скармливание включает питание вредителя на части растения, которая содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой одного или нескольких из кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), огневки кукурузной (ECB; *Ostrinia nubilalis*), соевой совки (SBL; *Pseudoplusia includens*), совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), табачной листовертки (TBW; *Heliothis virescens*), азиатского кукурузного мотылька (ACB, *Ostrinia furnacalis*), совки восточной луговой (*Mythimna separata*, OAW), чайной совки (TAW, *Athetis lepigone*), огневки желтой рисовой (SSB, *Chilo suppressalis*) и розовой стеблевой совки (PSB, *Sesamia inferens*).

В других аспектах настоящее изобретение относится к применению последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-9 в биоинформационном анализе для идентификации инсектицидного белка (например, инсектицидного против одного или нескольких из кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), огневки кукурузной (ECB; *Ostrinia nubilalis*), соевой совки (SBL; *Pseudoplusia includens*), совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), табачной листовертки (TBW; *Heliothis virescens*), азиатского кукурузного мотылька (ACB, *Ostrinia furnacalis*), совки восточной луговой (*Mythimna separata*, OAW), чайной совки (TAW, *Athetis lepigone*), огневки желтой рисовой (SSB, *Chilo suppressalis*) и розовой стеблевой совки (PSB, *Sesamia inferens*).

В других аспектах настоящее изобретение относится к применению полипептида, содержащего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 2 или 3 в биоанализе на насекомых для идентификации инсектицидного белка (например, инсектицидного против одного или нескольких из кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), огневки кукурузной (ECB; *Ostrinia nubilalis*), соевой совки (SBL; *Pseudoplusia includens*), совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), табачной листовертки (TBW; *Heliothis virescens*), азиатского кукурузного мотылька (ACB, *Ostrinia furnacalis*), совки восточной луговой (*Mythimna separata*, OAW), чайной совки (TAW, *Athetis lepigone*), огневки желтой рисовой (SSB, *Chilo suppressalis*) и розовой стеблевой совки (PSB, *Sesamia inferens*).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 представляет собой аминокислотную последовательность сконструированного BT-0200Cv2

SEQ ID NO:2 представляет собой аминокислотную последовательность сконструированного BT-0200Cv1

5 SEQ ID NO:3 представляет собой аминокислотную последовательность сконструированного BT-0200Cv3

SEQ ID NO:4 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность маиса для BT-0200Cv2

10 SEQ ID NO:5 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность сои для BT-0200Cv2

SEQ ID NO:6 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность маиса для BT-0200Cv1

SEQ ID NO:7 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность маиса для BT-0200Cv1

15 SEQ ID NO:8 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность маиса для BT-0200Cv3

SEQ ID NO:9 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность сои для BT-0200Cv3

20

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Подразумевается, что настоящее описание не представляет собой подробный перечень всех различных способов, с помощью которых может быть реализовано настоящее изобретение, или всех признаков, которые можно добавить к настоящему изобретению. Например, признаки, проиллюстрированные в отношении одного

25 варианта осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, а признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть удалены из такого варианта осуществления. Таким образом, в настоящем изобретении предполагается, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно исключить или опустить любой признак или комбинацию

30 признаков, изложенных в данном документе. Кроме того, в свете настоящего изобретения для специалистов в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты и дополнения к различным вариантам осуществления, предлагаемым в данном документе, которые не отступают от сути настоящего изобретения. Следовательно, следующие описания предназначены для иллюстрации

некоторых конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, а не для исчерпывающего определения всех их преобразований, комбинаций и вариантов.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Терминология, используемая в данном документе в описании настоящего изобретения, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предполагает ограничение настоящего изобретения.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, цитируемые в данном документе, включены с помощью ссылки во всей своей полноте для объяснения идей, относящихся к предложению и/или абзацу, в котором приведена данная ссылка.

Нуклеотидные последовательности, предусмотренные в данном документе, представлены в направлении от 5' - к 3'-концу слева направо и представлены с применением стандартного кода для представления нуклеиновых оснований, как изложено в §§1.821-1.825 в 37 CFR, и в стандарте ST.25 Всемирной организации интеллектуальной собственности (WIPO), например: аденин (А), цитозин (С), тимин (Т) и гуанин (Г).

Аналогичным образом аминокислоты обозначены с применением стандарта ST.25 WIPO, например: аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), цистеин (Cys; C), глутамин (Gln; Q), глутаминовая кислота (Glu; E), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

Если контекст не указывает иное, то, в частности, предполагается, что различные признаки настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно применять в любой комбинации. Более того, в настоящем изобретении также предполагается, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любой признак или комбинацию признаков, изложенных в данном документе, можно исключить или опустить. С целью иллюстрации, если в данном описании утверждается, что композиция содержит компоненты А, В и С, то это, в частности, предполагает, что любой из А, В или С или их комбинацию можно опустить и отклонить по отдельности или в любой комбинации.

## Определения

Для ясности определенные термины, используемые в данном описании, определены и представлены, как указано далее.

5           Формы единственного числа, используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "растение" является ссылкой на одно или несколько растений и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т. д.

10           Используемое в данном документе выражение "и/или" означает и охватывает любые возможные комбинации одного или нескольких из ассоциированных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в качестве альтернативы "или".

15           Используемый в данном документе термин "приблизительно" означает примерно, ориентировочно, около или в районе. Если термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы в большую и меньшую стороны от указанных числовых значений. В целом, термин "приблизительно", используемый в данном документе, модифицирует числовое значение в большую и меньшую стороны от указанного значения путем отклонения на 20 процентов, предпочтительно на 10 процентов вверх или вниз (больше или меньше). Что касается температуры, термин "приблизительно" означает  $\pm 1^\circ\text{C}$ , предпочтительно  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Если термин "приблизительно" применяется в контексте настоящего изобретения (например, в комбинациях с температурой или значениями молекулярной массы), предпочтительным является точное значение (то есть, без "приблизительно").

25           Применяемые в данном документе фразы, такие как "между приблизительно X и Y", "между приблизительно X и приблизительно Y", "от X до Y" и "от приблизительно X до приблизительно Y" (и схожие фразы), следует интерпретировать как включающие X и Y, если в контексте не указано иное.

30           "Активность" пестицидных белков по настоящему изобретению означает, что пестицидные белки действуют как активные при пероральном поглощении средства для контроля вредителя (например, насекомого), характеризуются токсическим действием (*например*, подавляют способность насекомого-вредителя выживать, расти и/или размножаться) и/или способны нарушать или сдерживать питание вредителя, что может привести или не привести к гибели насекомого. Когда пестицидный белок по

настоящему изобретению доставляется во вредителя, то результатом, как правило, является гибель вредителя, или вредитель не кормится на источнике, что делает пестицидный белок доступным для вредителя. «Пестицидной» называется токсическая биологическая активность, способная осуществлять контроль вредителя, такого как насекомое, нематода, гриб, бактерии или вирус, предпочтительно путем их уничтожения или разрушения. «Инсектицидной» называется токсическая биологическая активность, способная осуществлять контроль насекомых, предпочтительно путем их уничтожения. «Пестицидное средство» представляет собой средство, которое характеризуется пестицидной активностью. «Инсектицидное средство» представляет собой пестицидное средство, которое характеризуется инсектицидной активностью.

"Собранная последовательность", "собранный полинуклеотид", "собранная нуклеотидная последовательность" и т. п. в соответствии с настоящим изобретением представляют собой синтетический полинуклеотид, созданный с помощью выравнивания перекрывающихся последовательностей полинуклеотидов или частей секвенированных полинуклеотидов, т. е. k-меров (все возможные последовательности длиной k со считывания, полученного с помощью ДНК-секвенирования), которые определяют из геномной ДНК с использованием технологии ДНК-секвенирования. Собранные последовательности обычно содержат ошибки распознавания азотистых оснований, которые могут представлять собой неправильно определенные основания, вставки и/или делеции по сравнению с нативной последовательностью ДНК, содержащейся в геноме, из которого получают геномную ДНК. Следовательно, например, "собранный полинуклеотид" может кодировать белок, и в соответствии с настоящим изобретением как полинуклеотид, так и белок не являются продуктами природного происхождения, а существуют только вследствие деятельности человека.

Термин "химерный полинуклеотид" или "химерный белок" (или аналогичные термины), используемый в данном документе, относится к молекуле, содержащей два или более полинуклеотидов или белков или их фрагментов различного происхождения, собранных в единую молекулу. Термины "химерная конструкция", "химерный ген", "химерный полинуклеотид" или "химерная нуклеиновая кислота" относятся к любой конструкции или молекуле, которые содержат без ограничения (1) полинуклеотиды (например, ДНК), в том числе регуляторные и кодирующие полинуклеотиды, которые вместе не встречаются в природе (т. е. по меньшей мере один из полинуклеотидов в конструкции является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее

других полинуклеотидов), или (2) полинуклеотиды, кодирующие части белков, не связанные в естественных условиях, или (3) части промоторов, которые не связаны в естественных условиях. Кроме того, химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из разных источников, или могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из того же источника, но расположенные иным способом, чем встречающийся в природе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота содержат каскету экспрессии, содержащую полинуклеотид по настоящему изобретению под контролем регуляторных полинуклеотидов, в частности, под контролем регуляторных полинуклеотидов, функциональных у растений или бактерий. Слова “химерный” и “гибрид” по отношению к полинуклеотиду или белку используются в данном документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего изобретения “химерный” белок представляет собой белок, созданный путем слияния всех или части по меньшей мере двух разных белков. Химерный белок также может быть дополнительно модифицирован, чтобы он включал добавления, замены и/или делеции из одной или нескольких аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерный белок представляет собой химерный белок C<sub>1</sub>у, содержащий все или часть двух разных белков C<sub>1</sub>у, слитых вместе в единый полипептид. В некоторых вариантах осуществления химерный белок C<sub>1</sub>у дополнительно содержит дополнительные модификации, такие как добавления, замены и/или делеции одной или нескольких аминокислот. “Химерный инсектицидный белок” представляет собой химерный белок, который характеризуется инсектицидной активностью.

Термин “кодон-оптимизированная последовательность”, используемый в данном документе, означает нуклеотидную последовательность, в которой кодоны выбраны так, чтобы отражать склонность к определенным кодонам, которой может характеризоваться клетка- или организм-хозяин. Как правило, это осуществляется таким образом, чтобы сохранить аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая подлежит оптимизации. В определенных вариантах осуществления последовательность ДНК рекомбинантной ДНК-конструкции включает последовательность, которая была подвергнута кодон-

оптимизации для клетки (например, клетки животного, растения или гриба), в которой конструкция будет экспрессироваться. Например, в конструкции, которая будет экспрессироваться в растительной клетке, могут быть подвергнуты кодон-оптимизации вся последовательность или ее части (например, первый элемент для супрессии гена или элемент для экспрессии гена) для экспрессии в растении. См., например, патент США № 6121014, который включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению являются кодон-оптимизированными для экспрессии в растительной клетке (например, клетке двудольного растения или клетке однодольного растения) или бактериальной клетке.

“Контроль” насекомых означает подавление посредством токсического действия способности насекомых-вредителей к выживанию, росту, питанию и/или размножению, и/или ограничение повреждения или гибели культурных растений, вызванных насекомыми, и/или защиту максимального потенциального урожая сельскохозяйственной культуры при выращивании в присутствии насекомых-вредителей. “Контроль” насекомых может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения “контроль” насекомого означает уничтожение насекомых.

Термины «содержит» или «содержащий», при применении в настоящем описании, указывают на присутствие определенных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов или компонентов, но не исключают присутствие или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов или их групп.

Используемая в данном документе переходная фраза «по сути состоящий из» (и ее грамматические варианты) означает, что объем пункта формулы изобретения следует интерпретировать как охватывающий указанные материалы или этапы, перечисленные в пункте формулы изобретения, и таковые, которые существенно не изменяют основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения. Таким образом, предусмотрено, что термин “состоящий по сути из” при применении в пункте формулы настоящего изобретения, не интерпретируется как эквивалентный термину “содержащий”.

В контексте настоящего изобретения термин “соответствующий” или “соответствует” означает, что когда аминокислотные последовательности эталонной последовательности выровнены со второй аминокислотной последовательностью

(например, вариантом или гомологичными последовательностями), отличной от эталонной последовательности, аминокислоты, которые “соответствуют” определенным пронумерованным положениям во второй аминокислотной последовательности, представляют собой аминокислоты, которые выравниваются с этими положениями в эталонной аминокислотной последовательности, но не обязательно находятся в точных числовых положениях относительно конкретной эталонной аминокислотной последовательности по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин “белок Cry” означает инсектицидный белок типа кристаллического дельта-эндотоксина из *Bacillus thuringiensis*. Термин “белок Cry” может относиться к форме протоксина или любому его инсектицидно активному фрагменту или токсину, включая форму, подвергнутую частичному процессингу, и форму зрелого токсина (например, без N-концевого пептидильного фрагмента и/или C-концевого хвоста протоксина).

“Доставка” композиции или токсичного белка означает, что композиция или токсичный белок вступает в контакт с насекомым, способствуя пероральному поеданию композиции или токсичного белка, что приводит к токсическому действию и контролю насекомого. Данную композицию или токсичный белок можно доставлять множеством известных путей, в том числе без ограничения посредством экспрессии в трансгенном растении, составленной(составленных) белковой(белковых) композиции(композиций), распыляемой(распыляемых) белковой(белковых) композиции(композиций), матрицы с приманкой или с помощью любой другой известной в данной области системы доставки токсина.

Термин “домен” относится к набору аминокислот, консервативных в специфических положениях вдоль выравнивания последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты в других положениях гомологов могут отличаться, аминокислоты, которые являются высококонсервативными в специфических положениях, указывают на аминокислоты, которые, вероятно, являются необходимыми для структуры, стабильности или функции белка. Идентифицированные по их высокой степени консервативности в выровненных последовательностях семейства гомологов белков, они могут применяться в качестве идентификаторов для определения того, принадлежит ли любой рассматриваемый полипептид к ранее идентифицированной группе полипептидов. “Сконструированный” белок по настоящему изобретению относится к белку, последовательность которого отличается по меньшей мере одним аминокислотным положением от последовательности по

меньшей мере одного соответствующего исходного белка. Сконструированный белок может представлять собой мутантный белок, который содержит, например, одну или несколько модификаций, таких как делеции, добавления и/или замены по одному или нескольким аминокислотным положениям по сравнению с исходным белком.

- 5 Сконструированный белок может быть химерным белком и содержать, например, один или несколько обменных или перетасованных доменов или фрагментов из по меньшей мере двух исходных белков.

«Кассета экспрессии», используемая в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию  
10 конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующую клетку-хозяина, содержащую промотор, функционально связанный с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью, которая функционально связана с сигналами терминации. Она также обычно содержит последовательности, необходимые для  
15 правильной трансляции нуклеотидной последовательности. По меньшей мере один из компонентов кассеты экспрессии, содержащей представляющую интерес нуклеотидную последовательность, может быть гетерологичным по отношению к по  
20 меньшей мере одному из других ее компонентов. Кассета экспрессии может также представлять собой последовательность, которая встречается в природе, но была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Однако, как правило, кассета экспрессии является гетерологичной по отношению к  
25 хозяину, т. е. конкретная последовательность нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии не встречается в клетке-хозяине в естественных условиях, а должна быть введена в клетку-хозяина или предка клетки-хозяина с помощью события трансформации. Экспрессия нуклеотидной последовательности в кассете экспрессии  
30 может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцируемого промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда на клетку-хозяина воздействует некоторый конкретный внешний стимул. В случае многоклеточного организма, такого как растение, промотор также может быть специфичным по отношению к конкретной ткани, или органу, или стадии развития.

Кассета экспрессии, содержащая нуклеотидную последовательность, представляющую интерес, может быть химерной, что означает, что по меньшей мере один из ее компонентов является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее остальных компонентов. Кассета экспрессии также может представлять собой последовательность, которая содержит нативный промотор, управляющий ее

нативным геном, однако она была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Такое использование кассеты экспрессии обеспечивает то, что она является не встречающейся в природе в клетке, в которую она была введена.

Кассета экспрессии также необязательно может содержать участок терминации транскрипции и/или трансляции (т. е. участок терминации), функционирующий в растениях. Разнообразные терминаторы транскрипции доступны для применения в кассетах экспрессии, и они отвечают за терминацию транскрипции за пределами представляющей интерес гетерологичной нуклеотидной последовательности и правильное полиаденилирование мРНК. Область терминации может быть нативной по отношению к области инициации транскрипции, может быть нативной по отношению к функционально связанной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, может быть нативной по отношению к растению-хозяину или может быть получена из другого источника (т. е. быть чужеродной или гетерологичной по отношению к промотору, представляющей интерес нуклеотидной последовательности, растению-хозяину или любой их комбинации). Надлежащие терминаторы транскрипции включают без ограничения терминатор гена 35S CaMV, терминатор гена tml, терминатор гена нопалинсинтазы и/или терминатор гена rbcS-E9 гороха. Их можно применять как у однодольных, так и у двудольных растений. В дополнение, может применяться нативный терминатор транскрипции кодирующей последовательности. В контексте настоящего изобретения может применяться любой доступный терминатор, о котором известно, что он функционирует в растениях.

«Ген» представляет собой определенный участок, который расположен внутри генома и содержит кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты и, как правило, также содержит другие, преимущественно регуляторные нуклеиновые кислоты, ответственные за контроль экспрессии, иными словами транскрипции и трансляции кодирующей части. Ген также может содержать другие 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности и последовательности терминации. Дополнительными элементами, которые могут присутствовать, являются, например, интроны. Регуляторная последовательность нуклеиновой кислоты гена в норме может не быть функционально связанной с ассоциированной последовательностью нуклеиновой кислоты, как это встречается в природе, и в таком случае ген будет химерным геном.

«Представляющий интерес ген» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которая, в случае переноса в растение, придает растению требуемый признак,

такой как устойчивость к антибиотикам, устойчивость к вирусам, устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям или устойчивость к другим вредителям, переносимость гербицидов, переносимость абиотического стресса, мужская стерильность, модифицированный метаболизм жирных кислот, модифицированный метаболизм углеводов, улучшенная пищевая ценность, улучшенные характеристики при промышленном способе или измененная репродуктивная способность.

«Представляющий интерес ген» также может являться таким, который переносят в растения для получения коммерчески ценных ферментов или метаболитов в растении.

При использовании в отношении гена, или полинуклеотида, или полипептида термин “гетерологичный” относится к гену, или полинуклеотиду, или полипептиду, или их части, которые находятся не в своем естественном окружении (т. е. были изменены вследствие вмешательства человека). Например, гетерологичный ген может предусматривать полинуклеотид одного вида, введенный в организм другого вида. Гетерологичный ген также может предусматривать полинуклеотид, нативный по отношению к организму, но который был изменен определенным образом (например, подвергнут мутации, добавлен в виде множественных копий, связан с ненативным промоторным или энхансерным полинуклеотидом и т. д.). Гетерологичные гены дополнительно могут предусматривать полинуклеотиды генов растения, которые включают кДНК-формы гена растения; при этом кДНК могут экспрессироваться либо в смысловой (с образованием мРНК), либо антисмысловой ориентации (с образованием антисмыслового РНК-транскрипта, комплементарного мРНК-транскрипту). В одном аспекте настоящего изобретения гетерологичные гены отличаются от эндогенных генов растения тем, что полинуклеотид гетерологичного гена, как правило, присоединен к полинуклеотидам, содержащим регуляторные элементы, такие как промоторы, которые в естественном состоянии не встречаются ассоциированными с геном белка, кодируемого гетерологичным геном, или с полинуклеотидом гена растения в хромосоме, или ассоциирован с частями хромосомы, в которых он не встречается в природе (например, гены, экспрессируемые в локусах, в которых ген в норме не экспрессируется). Кроме того, “гетерологичный” полинуклеотид относится к полинуклеотиду, не ассоциированному в естественном состоянии с клеткой-хозяином, в которую его вводят, включая не встречающиеся в природе множественные копии встречающегося в природе полинуклеотида.

Термины “увеличивать”, “увеличение”, “увеличенный”, “повышать”, “повышенный”, “повышение” и “улучшение” и аналогичные термины, используемые в

данном документе, описывают повышение контроля вредителя растения, *например*, путем приведения растения в контакт с полипептидом по настоящему изобретению (например, путем трансгенной экспрессии или с помощью способов местного применения). Это увеличение контроля может быть относительно уровня контроля вредителя растений в отсутствие полипептида по настоящему изобретению (*например*, растение, которое не экспрессирует трансгенно полипептид или не подвергается местной обработке с помощью полипептида). Таким образом, в вариантах осуществления термины “увеличивать”, “увеличение”, “увеличенный”, “повышать”, “повышенный”, “повышение” и “улучшение” и аналогичные термины могут указывать на повышение на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше по сравнению с подходящим контролем (*например*, растением, частью растения, растительной клеткой, которые не приводятся в контакт с полипептидом по настоящему изобретению).

Термины “идентичность” или “идентичный” в контексте двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей относятся к процентной доле идентичных нуклеотидов или аминокислот в линейной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности у эталонной (“запрашиваемой”) последовательности (или ее комплементарной нити) при сравнении с тестируемой (“рассматриваемой”) последовательностью, когда две последовательности подвергнуты глобальному выравниванию. Если не указано иное, то термин “идентичность последовательности”, используемый в данном документе, относится к значению, полученному с применением алгоритма Нидлмана и Вунша ((1970) J. Mol. Biol. 48:443-453), реализованного в инструменте выравнивания EMBOSS Needle с применением файлов по умолчанию с матрицей EBLOSUM62 для белка с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение концевого гэпа = 0,5) или DNFull для нуклеиновых кислот с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение концевого гэпа = 0,5), или любой эквивалентной ему программы. EMBOSS Needle является доступным, например, от EMBL-EBI, как, например, на следующем веб-сайте: [ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) и как описано в следующей публикации: “The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019.” Madeira et al. Nucleic Acids Research,

June 2019, 47(W1):W636-W641. Термин “эквивалентная программа”, используемый в данном документе, относится к любой программе сравнения последовательностей, которая для любых двух исследуемых последовательностей создает выравнивание, характеризующееся идентичными совпадениями нуклеотидных или аминокислотных остатков и идентичным процентом идентичности последовательностей при сравнении с соответствующим выравниванием, созданным с помощью EMBOSS Needle. В некоторых вариантах осуществления по сути идентичные последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности могут выполнять по сути одинаковую функцию.

10 Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по сути идентичными, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях. Фраза "гибридируется специфически с" относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы только с определенной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях, в случае если 15 такая последовательность присутствует в сложной смеси (например, общих клеточных) ДНК или РНК. "Связываются(связывается) по сути" относится к комплементарной гибридизации между нуклеиновой кислотой-зондом и нуклеиновой кислотой-мишенью и охватывает незначительные несовпадения, которые могут быть компенсированы путем снижения жесткости сред для гибридизации, чтобы достичь необходимого 20 выявления последовательности нуклеиновой кислоты-мишени.

Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот или белки по сути идентичны, является то, что белок, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, характеризуется иммунологической перекрестной реактивностью с белком, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, или специфически связывается с ним. 25 Таким образом, белок обычно является по сути идентичным второму белку, например, если два белка отличаются только консервативными заменами.

Термин "инсектицидный", используемый в данном документе, определяется как токсическая биологическая активность, способная контролировать насекомого-вредителя, необязательно, но предпочтительно путем его уничтожения.

30 В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды или полипептиды по настоящему изобретению являются “выделенными”. Термин “выделенный” полинуклеотид или полипептид означает полинуклеотид или полипептид, которые больше не находятся в своей естественной среде. Выделенные полинуклеотид или полипептид по настоящему изобретению могут находиться в очищенной форме или

могут находиться в рекомбинантном хозяине, в таком как трансгенная бактерия или трансгенное растение. Следовательно, например, в формуле изобретения, “выделенный” полинуклеотид или полипептид охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, когда молекула нуклеиновой кислоты содержится в геноме трансгенного растения.

Термин “мотив”, или “консенсусная последовательность”, или “сигнатура” относится к короткой консервативной области в последовательности эволюционно родственных белков. Мотивы зачастую являются высококонсервативными частями доменов, но могут также включать только часть домена или располагаться вне консервативного домена (если все аминокислоты мотива оказываются за пределами определенного домена).

“Нативная” или “дикого типа” нуклеиновая кислота, полинуклеотид, нуклеотидная последовательность, полипептид или аминокислотная последовательность относится к встречающимся в природе или эндогенным нуклеиновой кислоте, полинуклеотиду, нуклеотидной последовательности, полипептиду или аминокислотной последовательности.

“Молекула нуклеиновой кислоты” или “нуклеиновая кислота” представляет собой сегмент однострессовой, двустрессовой или частично двустрессовой ДНК или РНК или их гибрид, который может быть выделен или синтезирован из любого источника. В контексте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, как правило, представляет собой сегмент ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляют собой выделенные молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержатся внутри вектора, растения, растительной клетки или бактериальной клетки.

Термины “нуклеиновая кислота”, “молекула нуклеиновой кислоты” и “полинуклеотид” используют взаимозаменяемо в данном документе.

“Функционально связанный” относится к ассоциации полинуклеотидов на одной молекуле нуклеиновой кислоты, вследствие чего функция одного влияет на функцию другого. Например, промотор функционально связан с кодирующим полинуклеотидом, если он способен влиять на экспрессию такого кодирующего полинуклеотида (т. е. такой кодирующий полинуклеотид находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующий полинуклеотид в смысловой или антисмысловой ориентации может быть функционально связан с регуляторными полинуклеотидами.

Используемые в данном документе термины “пестицидный”, “инсектицидный” и т. п. относятся к способности белков по настоящему изобретению контролировать организм вредителя или к количеству одного или нескольких белков по настоящему изобретению, которое может контролировать организм вредителя.

5 "Растение" представляет собой любое растение на любой стадии развития, в частности семенное растение. При осуществлении настоящего изобретения можно использовать растение или группу растений, включая однодольные или двудольные.

10 "Растительная клетка" представляет собой структурную и физиологическую единицу растения, содержащую протопласт и клеточную стенку. Растительная клетка может находиться в форме выделенной отдельной клетки, или культивированной клетки, или в виде части более высокоорганизованной единицы, такой как, например, растительная ткань, орган растения или целое растение.

15 "Культура растительных клеток" означает культуры единиц растения, таких как, например, протопласты, клетки в клеточной культуре, клетки в растительных тканях, пыльца, пыльцевые трубки, семязачатки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

"Растительный материал" относится к листьям, стеблям, корням, цветкам или частям цветков, плодам, пыльце, яйцеклеткам, зиготам, семенам, черенкам, клеточным или тканевым культурам или любой другой части или продукту растения.

20 "Орган растения" представляет собой отдельную и визуально структурированную и дифференцированную часть растения, такую как корень, стебель, лист, цветочный бутон или зародыш.

25 Используемый в данном документе термин "часть растения" включает без ограничения зародыши, пыльцу, семяпочки, семена, листья, цветки, ветки, плод, стебли, корни, корневые кончики, пыльники и/или растительные клетки, включая те растительные клетки, которые являются интактными в растениях и/или частях растений, растительные протопласты, растительные ткани, культуры растительных тканей, растительные каллусы, скопления растительного материала и т. п.

30 Используемый в данном документе термин "растительная ткань" означает группу растительных клеток, организованных в структурную и функциональную единицу. Включена любая ткань растения в полевых условиях или в культуре. Данный термин включает без ограничения целые растения, органы растений, семена растений, тканевую культуру и любые группы растительных клеток, организованных в структурные и/или функциональные единицы. Использование данного термина в

сочетании с любым конкретным типом растительной ткани, перечисленным выше или иным образом охваченным данным определением, или при его отсутствии не предполагается как исключаящее любой другой тип растительной ткани.

5 “Представляющий интерес полинуклеотид” или “представляющая интерес нуклеиновая кислота” относится к любому полинуклеотиду, который при переносе в организм, например растение, придает организму требуемую характеристику, такую как устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям, толерантность к гербицидам, устойчивость к антибиотикам, улучшенная питательная ценность, 10 улучшенные показатели в производственном процессе, выработка коммерчески ценных фермента или метаболита, измененная репродуктивная способность и т. п.

Следует понимать, что “часть” или “фрагмент” полипептида по настоящему изобретению означает аминокислотную последовательность или последовательность 15 нуклеиновой кислоты уменьшенной длины по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В соответствующих случаях такая часть или фрагмент согласно настоящему изобретению могут быть включены в более длинный полипептид или 20 нуклеиновую кислоту, частью которого/которой они являются (например, меченый или слитый белок или кассету экспрессии). В некоторых вариантах осуществления “часть” или “фрагмент” по сути сохраняют активность, такую как инсектицидная активность (например, по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 100% активности) полноразмерного белка или нуклеиновой кислоты, или даже имеют более 25 значительную активность, например, инсектицидную активность, чем полноразмерный белок).

Термины “белок”, “пептид” и “полипептид” используются в данном документе 25 взаимозаменяемо.

Термин “промотор”, используемый в данном документе, относится к полинуклеотиду, обычно расположенному выше (5') сайта начала трансляции кодирующей последовательности, который контролирует экспрессию кодирующей последовательности, путем обеспечения распознавания для РНК-полимеразы и других 30 факторов, необходимых для надлежащей транскрипции. Например, промотор может содержать область, содержащую базальные промоторные элементы, распознаваемые РНК-полимеразой, область, содержащую 5'-нетранслируемую область (UTR) кодирующей последовательности, и необязательно интрон.

“Не активный в пыльце промотор” представляет собой промотор, который управляет экспрессией генов в пыльце целевых видов растений на низком или не поддающемся выявлению уровне. Количественную оценку мРНК-транскриптов представляющего интерес белка в пыльце можно произвести различными способами, включая qRT-PCR/RNA-Seq; уровень белка можно измерить с помощью широко применяемых методик ELISA и вестерн-блоттинга. В настоящем изобретении промотор считается не активным в пыльце, если он управляет экспрессией белка по настоящему изобретению на уровне <10 нг/мг TSP (общего растворимого белка) в пыльце.

Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе, относится к форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), или белка, или организма, которая обычно не будет встречаться в природе и которая как таковая была создана посредством вмешательства человека. Термин "молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты", используемый в данном документе, означает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую комбинацию полинуклеотидов, которые в природе не встречаются вместе и являются результатом вмешательства человека, например, молекулу нуклеиновой кислоты, которая состоит из комбинации по меньшей мере двух полинуклеотидов, гетерологичных друг другу, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая была синтезирована искусственно, например, полинуклеотид, синтезированный с помощью собранной нуклеотидной последовательности, и содержит полинуклеотид, отличающийся от полинуклеотида, который будет в норме существовать в природе, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, искусственно введенный в геномную ДНК клетки-хозяина, и ассоциированную фланкирующую ДНК генома клетки-хозяина. Другим примером рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты является молекула ДНК, полученная в результате вставки трансгена в геномную ДНК растения, что в конечном итоге может приводить к экспрессии молекулы рекомбинантной РНК или белка в данном организме. Используемый в данном документе термин “рекомбинантное растение” означает растение, которое в норме не будет существовать в природе, и оно является результатом вмешательства человека и содержит трансгенную молекулу или гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, которую можно встроить в его геном. В результате такого изменения генома рекомбинантное растение явно отличается от родственного растения дикого типа. “Рекомбинантные” бактерии представляют собой не встречающиеся в природе бактерии, которые содержат гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Такие бактерии могут быть созданы путем трансформации

бактерий с помощью молекулы нуклеиновой кислоты или путем конъюгационного переноса плазмиды из одного бактериального штамма в другой, при этом плазида содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

5 Термины "снижать", "сниженный", "снижение", "сокращение", "уменьшать" и "подавлять" (и их грамматические варианты) и аналогичные термины, используемые в данном документе, относятся к уменьшению выживаемости, роста и/или размножения вредителя растений, например, путем приведения растения в контакт с полипептидом по настоящему изобретению (например, путем трансгенной экспрессии или способами местного применения). Это уменьшение выживаемости, роста и/или размножения 10 может быть относительно уровня, наблюдаемого в отсутствие полипептида по настоящему изобретению (например, растение, которое не экспрессирует трансгенно полипептид или не подвергается местной обработке полипептидом). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления термины "снижать", "сниженный", "снижение", "сокращение", "уменьшать" и "подавлять" (и их грамматические варианты) и 15 аналогичные термины означают уменьшение на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более по сравнению с растением, которое не вступает в контакт с полипептидом по настоящему изобретению (например, растение, которое не экспрессирует трансгенно полипептид или не подвергается местной обработке 20 полипептидом). В иллюстративных вариантах осуществления снижение приводит к отсутствию или фактически отсутствию (т. е. незначительному количеству, например, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или даже менее чем приблизительно 1%) выявляемой выживаемости, роста и/или размножения вредителя растений.

25 "Регуляторные элементы" относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, и влияющим на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности 30 включают энхансеры, промоторы, трансляционные энхансерные последовательности, интроны и сигнальные последовательности полиаденилирования. Они включают природные и синтетические последовательности, а также последовательности, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и природных последовательностей. Регуляторные последовательности могут определять уровень

экспрессии, пространственный и временной паттерн экспрессии и для подгруппы промоторов экспрессию в индуктивных условиях (регуляция внешними факторами, такими как свет, температура, химические вещества и гормоны).

Используемый в данном документе термин “селектируемый маркер” означает нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии придает отличительный фенотип растению, части растения и/или растительной клетке, экспрессирующим маркер, и, таким образом, дает возможность отличать такие трансформированные растения, части растений и/или растительные клетки от тех, которые не имеют маркера. Такая нуклеотидная последовательность может кодировать либо селектируемый, либо подвергаемый скринингу маркер в зависимости от того, придает ли маркер признак, по которому можно провести отбор с помощью химических средств, например путем применения селективного средства (например, антибиотика, гербицида и т. п.), или от того, является ли маркер просто признаком, который можно идентифицировать за счет наблюдения или тестирования, например путем скрининга (например, признаком, определяемым в R-локусе).

"Синтетический" относится к нуклеотидной последовательности, содержащей основания или структурный(-е) признак(и), отсутствующие в природной последовательности. Например, синтетической считается искусственная последовательность, кодирующая белок по настоящему изобретению, которая по содержанию G+C и нормальному распределению кодонов больше похожа на гены двудольных или однодольных растений.

Для используемого в данном документе белка по настоящему изобретению, который является “токсичным” для насекомого-вредителя, подразумевается, что белок действует в качестве активного при пероральном поглощении средства для контроля насекомых для уничтожения насекомого-вредителя, или белок способен нарушать или ограничивать питание насекомых, или вызывать подавление роста насекомого-вредителя, причем каждое из них может вызвать или не вызвать гибель насекомого. Когда токсичный белок по настоящему изобретению доставляется в организм насекомого или насекомое приводится в контакт с токсичным белком при пероральном поглощении, как правило, результатом является гибель насекомого, или замедление роста насекомого, или насекомое прекращает питаться на источнике, который делает токсичный белок доступным для насекомого.

Термины “токсиновый фрагмент” и “токсиновая часть” используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения фрагмента или части более длинного

(например, полноразмерного) инсектицидного белка по настоящему изобретению, при этом “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” сохраняет инсектицидную активность. Например, в данной области техники известно, что нативные белки Cгу экспрессируются в виде протоксинов, которые подвергаются процессингу на N-терминальном и C-терминальном концах с образованием зрелого токсина. В некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” химерного инсектицидного белка по настоящему изобретению усечены на N-конце и/или C-конце. В некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” усекается на N-конце с удалением части или всего N-концевого пептидильного фрагмента и необязательно содержат по меньшей мере приблизительно 400, 425, 450, 475, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580 или 590 смежных аминокислот инсектицидного белка, конкретно описанного в данном документе, или аминокислотной последовательности, которая по сути идентична ему. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” инсектицидного белка усекается на N-конце (например, с исключением части или всего пептидильного фрагмента), например, N-концевое усечение одной аминокислоты или более чем одной аминокислоты, например, до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” инсектицидного белка усекается на C-конце (например, с исключением части или всего протоксинового хвоста), например, C-концевое усечение одной аминокислоты или более чем одной аминокислоты, например, до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 560 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” включают домены I и II, а также коровый домен III. В некоторых вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” представляют собой зрелый (т. е. подвергнутый процессингу) токсин (например, токсин Cгу).

“Трансформация” представляет собой процесс введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина или организм-хозяин. В конкретных вариантах

осуществления «трансформация» означает стабильную интеграцию молекулы ДНК в геном (ядерный или пластидный) представляющего интерес организма.

“Трансформированный” и “трансгенный” относится к организму-хозяину, такому как бактерия или растение, в который была введена гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина, или же молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в виде внехромосомной молекулы. Такая внехромосомная молекула может быть автореплицирующейся. Подразумевается, что трансформированные клетки, ткани или растения охватывают не только конечный продукт процесса трансформации, но также и его трансгенного потомка. Термины "нетрансформированный", "нетрансгенный" или "нерекомбинантный" хозяин относятся к организму дикого типа, например, бактерии или растению, не содержащим гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты.

Термин “вектор” относится к композиции для переноса, доставки или введения нуклеиновой кислоты (или нуклеиновых кислот) в клетку. Вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную(-ые) последовательность(-и), подлежащую(-ие) переносу, доставке или введению. Примеры векторов включают плазмидный, космидный, фагмидный вектор, вектор на основе искусственной хромосомы, фаговый или вирусный вектор.

#### 20 Инсектицидные белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты

В настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для контроля опасных вредителей растений. В частности, настоящее изобретение относится к сконструированному подобным Cg1B инсектицидным белкам и полинуклеотидам, которые кодируют такие сконструированные белки. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам получения и применения белков и полинуклеотидов по настоящему изобретению для контроля насекомых-вредителей.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность инсектицидного белка по настоящему изобретению может быть выведена из собранной полинуклеотидной последовательности с использованием геномов из штаммов *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Штаммы *Bt* могут быть выделены стандартными методиками и либо протестированы на токсичность для насекомых-вредителей по настоящему изобретению, либо использованы для выделения геномной ДНК без тестирования штамма *Bt* на токсичность для насекомых. Как правило, штаммы *Bt* могут быть выделены из любого образца из окружающей среды, включая почву, растение, насекомого, зерновую пыль

на элеваторе, испорченное молоко и другой материал образцов, способами, известными из уровня техники. См., например, Travers et al. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53:1263-1266; Saleh et al. (1969) Can J. Microbiol. 15:1101-1104; DeLucca et al. (1981) Can J. Microbiol. 27:865-870; и Norris, et al. (1981) "The genera Bacillus and Sporolactobacillus," In Starr et al. (eds.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, Vol. II, Springer Verlag Berlin Heidelberg.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полинуклеотиды могут быть введены в *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) для продуцирования инсектицидного белка или для применения штамма *Bt* в качестве средства для микробного контроля. Поэтому, в некоторых вариантах осуществления представлен рекомбинантный штамм *Bt*, который экспрессирует инсектицидный белок по настоящему изобретению, содержащий, по сути состоящий из или состоящий из аминокислотной последовательности, характеризующейся от по меньшей мере 90% до по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с любой под SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В следующих вариантах осуществления инсектицидный белок содержит, по сути состоит из или состоит из любой под SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или токсинового фрагмента любых указанных белков.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 91% или по меньшей мере 92% или по меньшей мере 93% или по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% или по меньшей мере 96% или по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,1% или по меньшей мере 99,2% или по меньшей мере 99,3% или по меньшей мере 99,4% или по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,6% или по меньшей мере 99,7% или по меньшей мере 99,8% или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 91% или по меньшей мере 92% или по меньшей мере 93% или по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% или по меньшей мере 96% или по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,1% или по меньшей мере 99,2% или по меньшей мере 99,3% или по меньшей мере 99,4% или по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,6% или по меньшей мере 99,7% или по меньшей мере 99,8% или по меньшей мере 99,9%

идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 91% или по меньшей мере 92% или по меньшей мере 93% или по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% или по меньшей мере 96% или по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,1% или по меньшей мере 99,2% или по меньшей мере 99,3% или по меньшей мере 99,4% или по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,6% или по меньшей мере 99,7% или по меньшей мере 99,8% или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления полипептид содержит SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

Настоящее изобретение относится к новым химерным инсектицидным белкам, содержащим по меньшей мере одну область из первого белка Cry (например, подобного Cry1B белка и по сути идентичных ему вариантов). В некоторых вариантах осуществления представлен химерный инсектицидный белок, содержащий область из двух или более разных белков Cry. В некоторых вариантах осуществления N-концевая область первого белка Cry слита с C-концевой областью из другого белка Cry (например, другого белка Cry1) с образованием химерного инсектицидного белка (например, химерного инсектицидного белка Cry). В иллюстративных вариантах осуществления C-концевая область из другого белка Cry может представлять собой C-концевую область другого белка Cry1 или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по существу идентична C-концевой области из другого белка Cry1. В некоторых вариантах осуществления другой белок Cry1 включает без ограничения белок Cry1C (например, белок Cry1Ca или Cry1Cb). В следующих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему а) домен I, происходящий из белка Cry1B; б) домен II, происходящий из белка Cry1B; и с) домен III, происходящий из белка Cry1C. В следующих вариантах осуществления полипептид содержит C-конец из белка Cry1B. В некоторых вариантах осуществления домены I и II химерного белка содержат первые 490 остатков. В некоторых вариантах осуществления домен III белка состоит из остатков 491-673. В следующих вариантах осуществления C-концевой хвост содержит аминокислотные остатки 674-1233.

Химерные инсектицидные белки также охватывают последовательности, полученные мутагенными и рекомбиногенными процедурами, такими как ДНК-

шаффлинг. С помощью такой процедуры один или несколько различных областей, кодирующих токсичный белок, можно применять для создания новых токсичных белков, обладающих требуемыми свойствами. Следовательно, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов получают из популяции полинуклеотидов с родственными последовательностями, содержащими участки последовательности, которые характеризуются значительной степенью идентичности последовательности и могут подвергаться гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с применением данного подхода мотивы последовательности, кодирующие представляющий интерес домен, можно подвергать шаффлингу между пестицидным геном по настоящему изобретению и другими известными пестицидными генами с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным представляющим интерес свойством, таким как повышенная инсектицидная активность. Стратегии для такого ДНК-шаффлинга известны из уровня техники. См., например, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Обмен доменов или шаффлинг является другим механизмом для создания химерных инсектицидных белков. Домены можно обменивать между Cry1B-подобными белками, что приводит к химерным токсичным белкам с улучшенными пестицидной активностью или спектром мишеней. Способы получения рекомбинантных белков и тестирования их в отношении пестицидной активности хорошо известны из уровня техники (см., например, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

Термины "N-концевая область" и "C-концевая область" не обязательно указывают на то, что большинство N-концевых или C-концевых аминокислот (например, N-конец или C-конец) соответственно из полноразмерного белка включены в область. Например, специалистам в данной области техники хорошо известно, что протоксины Cry подвергаются процессингу как с N-конца, так и с C-конца с получением зрелого (т. е. подвергнутого процессингу) токсина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления "N-концевая область" и/или "C-концевая область" исключает некоторые или все из подвергнутых процессингу частей протоксина, так что

химерный инсектицидный белок содержит зрелый белок токсина (например, домены I, II и III белка Cry) без части или всего N-концевого пептидильного фрагмента и/или C-концевого протоксинового хвоста, или полипептид, который по сути идентичен зрелому белку токсина. В некоторых вариантах осуществления химерный инсектицидный белок содержит пептидильный фрагмент и/или хвост протоксина. В некоторых вариантах осуществления химерный инсектицидный белок не содержит пептидильный фрагмент или хвост протоксина, т. е. соответствует зрелому подвергнутому процессингу токсину.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидные белки, которые были активированы посредством протеолитического процессинга, например, с помощью протеаз, полученных из пищеварительного канала насекомого, могут быть охарактеризованы, и идентифицированы N-концевые или C-концевые аминокислоты активированного токсинового фрагмента. Токсиновый фрагмент сконструированного инсектицидного белка по настоящему изобретению, полученный путем введения или удаления сайтов процессирования протеазами в соответствующих положениях в кодирующей последовательности для обеспечения или устранения протеолитического расщепления более крупного белка протеазами насекомого, растения или микроорганизма, также попадает в объем настоящего изобретения. Под конечным результатом такой манипуляции следует понимать образование молекул токсинового фрагмента с такой же или лучшей активностью, что и интактный инсектицидный белок.

Раскрытые инсектицидные белки обладают инсектицидной активностью против чешуекрылых вредителей. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) характеризуется/характеризуются активностью в отношении одного или нескольких из следующих неограничивающих примеров вредителя, относящегося к чешуекрылым: *Spodoptera* spp., таких как *S. frugiperda* (кукурузная листовая совка), *S. littoralis* (египетская хлопковая совка), *S. ornithogalli* (желто-полосатая совка), *S. praefica* (западная желто-полосатая совка), *S. eridania* (южная совка), *S. litura* (табачная совка/азиатская хлопковая совка), *S. cosmioides* (черная совка), *S. exempta* (африканская совка), *S. mauritia* (луговая совка) и/или *S. exigua* (свекольная совка); *Ostrinia* spp., таких как *O. nubilalis* (огневка кукурузная) и/или *O. furnacalis* (азиатский кукурузный мотылек); *Plutella* spp., таких как *P. xylostella* (капустная моль); *Agrotis* spp., таких как *A. ipsilon* (совка-ипсилон), *A. segetum* (совка озимая), *A. gladiaria* (глиняная совка) и/или *A. orthogonia* (совка прямоугольная); *Striacosta* spp., таких как

*S. albicosta* (западная бобовая совка); *Helicoverpa* spp., таких как *H. zea* (совка кукурузная/американская кукурузная совка), *H. punctigera* (австралийская совка) и/или *H. armigera* (совка хлопковая); *Heliothis* spp., таких как *H. virescens* (табачная листовертка); *Diatraea* spp., таких как *D. grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная) и/или *D. saccharalis* (тростниковая огневка); *Trichoplusia* spp., таких как *T. ni* (совка ни); *Sesamia* spp., таких как *S. nonagroides* (мотылек кукурузный средиземноморский), *S. inferens* (розовая стеблевая совка) и/или *S. calamistis* (розовая стеблевая совка); *Pectinophora* spp., таких как *P. gossypiella* (хлопковая моль); *Cochylis* spp., таких как *C. hospes* (полосатая подсолнечная моль); *Manduca* spp., таких как *M. sexta* (табачный бражник) и/или *M. quinquemaculata* (томатный бражник); *Elasmopalpus* spp., таких как *E. lignosellus* (огневка кукурузная стеблевая малая); *Pseudoplusia* spp., таких как *P. includens* (соевая совка); *Anticarsia* spp., таких как *A. gemmatalis* (совка бархатных бобов); *Plathypena* spp., таких как *P. scabra* (совка клеверная); *Pieris* spp., таких как *P. brassicae* (белянка капустная), *Papaipema* spp., таких как *P. nebris* (стеблевой мотылек обыкновенный); *Pseudaletia* spp., таких как *P. unipuncta* (луговая совка); *Peridroma* spp., таких как *P. saucia* (пестрая совка); *Keiferia* spp., таких как *K. lycopersicella* (томатная острица); *Artogeia* spp., таких как *A. rapae* (белянка репная); *Phthorimaea* spp., таких как *P. operculella* (картофельная моль); *Chrysodeixis* spp., таких как *C. includens* (золотистая двупятнистая совка); *Feltia* spp., таких как *F. ducens* (тусклая совка); *Chilo* spp., таких как *C. suppressalis* (огневка желтая рисовая), *C. agamemnon* (восточная кукурузная огневка) и *C. partellus* (крапчатая стеблевая моль), *Snaphalocrocis* spp., таких как *C. medinalis* (огневка рисовая), *Conogethes* spp., таких как *C. punctiferalis* (желтая персиковая моль), *Mythimna* spp., таких как *M. separata* (совка восточная луговая), *Athetis* spp., таких как *A. lepigone* (чайная совка), *Busseola* spp., таких как *B. fusca* (африканский кукурузный стеблевой сверлильщик), *Etiella* spp., таких как *E. zinckenella* (огневка акациевая), *Leguminivora* spp., таких как *L. glycinivorella* (плодожорка соевая), *Matsumuraeses* spp., таких как *M. phaseoli* (плодожорка адзуки), *Omiodes* spp., таких как *O. indicata* (соевый мотылек/паутинная гусеница бобовых листьев), *Rachiplusia* spp., таких как *R. ni* (подсолнечниковая совка), или любой комбинации вышеуказанного.

Раскрытый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(белки) может также характеризоваться инсектицидной активностью в отношении жесткокрылых, полужесткокрылых, двукрылых, *Lygus* spp. и/или других колющих и сосущих насекомых, например, из отряда Orthoptera или Thysanoptera. В некоторых вариантах

осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) характеризуется/характеризуются активностью в отношении одного или нескольких из следующих неограничивающих примеров вредителя, относящегося к жесткокрылым: *Diabrotica* spp., таких как *D. barberi* (северный кукурузный жук), *D. virgifera virgifera* (западный кукурузный жук), *D. undecimpunctata howardii* (южный кукурузный жук), *D. balteata* (жук огуречный полосатый), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (западный пятнистый огуречный жук), *D. significata* (3-точечный листоед), *D. speciosa* (жук тыквенный), *D. virgifera zeaе* (мексиканский кукурузный жук), *D. beniensis*, *D. cristata*, *D. curviphustalata*, *D. dissimilis*, *D. elegantula*, *D. emorsitans*, *D. graminea*, *D. hispanloe*, *D. lemniscata*, *D. linsleyi*, *D. milleri*, *D. nummularis*, *D. occlusal*, *D. porrecea*, *D. scutellata*, *D. tibialis*, *D. trifasciata* и/или *D. viridula*; *Leptinotarsa* spp., таких как *L. decemlineata* (колорадский жук); *Chrysomela* spp., таких как *C. scripta* (листоед тополевый); *Hypothenemus* spp., таких как *H. hampei* (жук кофейный); *Sitophilus* spp., таких как *S. zeamaіs* (кукурузный долгоносик); *Epitrix* spp., таких как *E. hirtipennis* (табачный жук-блошка) и/или *E. cucumeris* (картофельный жук-блошка); *Phyllotreta* spp., таких как *P. cruciferae* (блошка крестоцветная) и/или *P. pusilla* (западная черная блошка); *Anthonomus* spp., таких как *A. eugenii* (перечный долгоносик); *Hemicrepidus* spp., таких как *H. memnonius* (проволочники); *Melanotus* spp., таких как *M. communis* (американский многоядный щелкун); *Ceutorhynchus* spp., таких как *C. assimilis* (рапсовый семенной скрытнохоботник); *Phyllotreta* spp., таких как *P. cruciferae* (блошка крестоцветная); *Aeolus* spp., таких как *A. mellillus* (проволочник); *Aeolus* spp., таких как *A. mancus* (пшеничный проволочник); *Horistonotus* spp., таких как *H. uhlerii* (песчаный проволочник); *Sphenophorus* spp., таких как *S. maidis* (долгоносик кукурузный), *S. zeaе* (долгоносик тимофеечный), *S. parvulus* (мятликовый долгоносик) и *S. callosus* (долгоносик клубеньковый эспарцетовый); *Phyllophaga* spp. (личинки хрущей); *Chaetocnema* spp., таких как *C. pulicaria* (земляная кукурузная блошка); *Popillia* spp., таких как *P. japonica* (японский жук); *Epilachna* spp., таких как *E. varivestis* (мексиканский бобовый жук); *Cerotoma* spp., таких как *C. trifurcate* (бобовый листоед); *Epicauta* spp., таких как *E. pestifera* и *E. lemniscata* (нарывники); или любой комбинации вышеуказанного. К насекомым отряда Hemiptera относятся без ограничения *Chinavia hilaris* (щитник зеленый древесный); *Anasa tristis* De Geer (кабачковый клоп); *Blissus leucopterus* (пшеничный клоп); *Corythuca gossypii* Fabricius (хлопковый клоп); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатный); *Dysdercus suturellus* Hernch-Schaffer (хлопковый красноклоп); *Euschistus servus* Say (коричневый клоп-щитник);

*E. variolarius* Palisot de Beauvois (коричнево-мраморный клоп); *Graptostethus* spp. (группа земляных клопов); *Leptoglossus corculus* Say (сосновый семенной клоп-краевик); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп-слепняк полевой); *L. hesperus* Knight (западный клоп-слепняк травяной); *L. pratensis* Linnaeus (клопик луговой);  
 5 *L. rugulipennis* Poppius (клопик опушенный); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зеленый яблонный клоп); *Nezara viridula* Linnaeus (незара зеленая); *Oebalus pugnax* Fabricius (клоп-щитник рисовый); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (молочайный клоп);  
*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый), *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблочный северный); *Cyrtopeltis modestus* Distant (клоп томатный); *Cyrtopeltis notatus*  
 10 Distant (слепняк); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (слепняк белоточечный);  
*Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп-слепняк гледичии); *Labopidicola allii* Knight (слепняк луковый); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп быстрый); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (клоп-слепняк четырехполосный);  
 15 *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (ложная черепашка); *Nezara viridula* Linnaeus (незара зеленая); *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blostomatidae* spp.; *Reduviidae* spp. и *Cimicidae* spp. К насекомым отряда Diptera относятся без ограничения *Liriomyza* spp. такие как *L. trifolii* (клеверный минер) и *L. sativae* (овощной листовой минер); *Scrobipalpula* spp. такие как  
 20 *S. absoluta* (томатная минирующая моль); *Delia* spp. такие как *D. platura* (ростковая муха), *D. brassicae* (муха малая весенняя) и *D. radicum* (муха капустная весенняя); *Psilia* spp. такие как *P. rosae* (морковная муха); *Tetanops* spp. такие как *T. myopaeformis* (Корневая свекловичная муха); и любая комбинация вышеуказанного. Насекомые в отряде Orthoptera включают без ограничения *Melanoplus* spp., такие как *M. differentialis*  
 25 (кобылка отличительная), *M. femurrubrum* (кобылка красноногая), *M. bivittatus* (кобылка двухполосая); и любую их комбинацию. Насекомые в отряде Thysanoptera включают без ограничения *Frankliniella* spp., такие как *F. occidentalis* (западный цветочный трипс) и *F. fusca* (американский табачный трипс); и *Thrips* spp., такие как *T. tabaci* (табачный трипс), *T. palmi* (трипс Пальми); и любую комбинацию вышеуказанного.  
 30 Раскрытый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(белки) также может(могут) обладать инсектицидной активностью против любого одного или нескольких из следующих: *Phyllophaga* spp., *Rhopalosiphum maidis*, *Pratylenchus penetrans*, *Melanotus cribulosus*, *Cyclocephala lurida*, *Limonius californicus*, *Tetranychus urticae*, *Haplothrips aculeatus*, *Tetranychus truncates*, *Anomala corpulenta*, *Oedaleus infernalis*, *Frankliniella tenuicornis*,

*Tetranychus cinnabarinus*, *Aiolopus thalassinus tamulus*, *Trachea tokionis*, *Laodelphax striatellus*, *Holotrichia oblita*, *Dichelops furcatus*, *Diloboderus abderu*, *Dalbulus maidis*, *Astylus variegathus*, *Scaptocoris castanea*, *Locusta migratoria manilensis*, *Agriotes lineatus*, *Peregrinus maidis*, *Oscinella frit*, *Frankliniella williamsi*, *Zyginidia manaliensis*, *Atherigona soccata*, *Nicentrites testaceipes*, *Myllocerus undecimpustulatus*, *Atherigona naquii*, *Amsecta albistriga*, *Plodia interpunctella*, *Melanotus caudex*, *Microtermes spp.*, *Atherigona oryzae*, *Tanymecus dilaticollis*, *Delphacodes kuschelli*, *Lepidiota stigma*, *Phyllophaga hellery*, *Tribolium castaneum*, *Pelopidas mathias*, *Oxya chinensis (Thunberg)*, *Stenocranus pacificus*, *Scutigerella immaculata*, *Chrysodeixis chalcites*, *Euproctis sp. (Lymantriidae)*, *Phyllotreta spp. (undulata)*, *Reptalus panzer*, *Cyrtacanthacris tartarica Linnaeus*, *Orgyia postica*, *Dactylispa lameyi*, *Patanga succincta Johanson*, *Tetranychus spp.*, *Calomycterus sp.*, *Adoretus compressus Weber* и *Paratetranychus stickney*.

Необязательно сконструированные инсектицидные белки по настоящему изобретению обладают повышенной активностью против одного или нескольких чешуекрылых вредителей по сравнению с одним или несколькими из родственных молекул (например, первым белком Cry и другим белком Cry). В некоторых вариантах осуществления сконструированный инсектицидный белок обладает повышенной инсектицидной активностью против кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*) по сравнению с одной или несколькими родственными молекулами (например, первым белком Cry и другим белком Cry). В вышеизложенных вариантах осуществления сконструированный инсектицидный белок может необязательно обладать инсектицидной активностью против насекомого-вредителя или колонии кукурузной листовой совки, которая характеризуется устойчивостью к другому инсектицидному средству, в том числе другому инсектицидному белку (такому как, например, белок *Bt*). В некоторых вариантах осуществления сконструированный инсектицидный белок обладает повышенной активностью против колонии кукурузной листовой совки, которая устойчива к белку Vip3A (например, Vip3Aa, включая без ограничения объект маиса MIR162) или белку Cry1F (например, Cry1Fa, включая без ограничения объект маиса TC1507).

Настоящее изобретение также охватывает антитела, которые специфически связываются со сконструированными инсектицидными белками по настоящему изобретению. Антитело необязательно может быть моноклональным антителом или поликлональной антисывороткой. Такие антитела могут быть получены с применением стандартных иммунологических методик получения поликлональной антисыворотки и

при необходимости иммортализации антителопродуцирующих клеток иммунизированного организма-хозяина для получения источников моноклональных антител. Методики получения антител к любому представляющему интерес веществу хорошо известны, например, описаны в Harlow and Lane (1988. *Antibodies a laboratory manual*. pp. 726. Cold Spring Harbor Laboratory) и в Goding (*Monoclonal Antibodies: Principles & practice*, 1986. Academic Press, Inc., Orlando, FL). Настоящее изобретение также охватывает инсектицидный белок, который перекрестно реагирует с антителом, в частности, моноклональным антителом, вырабатываемым против одного или нескольких химерных инсектицидных белков по настоящему изобретению.

10 Антитела по настоящему изобретению применимы, например, в иммунологических анализах, для определения количества или присутствия химерного инсектицидного белка по настоящему изобретению или антигенно родственного полипептида, например, в биологическом образце. Такие анализы также применимы в получении композиций, содержащих один или несколько химерных инсектицидных  
15 белков по настоящему изобретению или антигенно родственного полипептида, с обеспечением контроля качества. Кроме того, антитела можно применять для оценки эффективности рекомбинантного получения одного или нескольких химерных белков по настоящему изобретению или антигенно родственного полипептида, а также для скрининга библиотек экспрессии на предмет наличия нуклеотидной  
20 последовательности, кодирующей один или несколько химерных белков по настоящему изобретению или антигенно родственного полипептида. Антитела, кроме того, находят применение в качестве аффинных лигандов для очистки или выделения любого одного или нескольких белков по настоящему изобретению или антигенно родственного полипептида.

25 В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей кодирующую последовательность, которая кодирует полипептиды под любым из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит кодирующую последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий а) домен I, происходящий из белка C<sub>ry1B</sub>; б) домен II, происходящий из белка C<sub>ry1B</sub>; в) домен III, происходящий из белка C<sub>ry1C</sub>; и д) С-конец, происходящий из белка C<sub>ry1B</sub>.

#### Кассеты и векторы экспрессии

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к кассетам и векторам экспрессии, которые кодируют инсектицидные белки по настоящему изобретению. В

некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности, содержащие синтетические нуклеотидные последовательности, которые являются кодон-оптимизированными для экспрессии в растении (например, в трансгенном однодольном растении-хозяине или трансгенном двудольном растении-хозяине, таком как растение кукурузы или сои). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная кодирующая последовательность является частично или полностью синтетической. В иллюстративных вариантах осуществления для экспрессии в трансгенных растениях, таких как кукуруза или соя, нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению модифицируют и/или оптимизируют. Например, хотя во многих случаях гены микроорганизмов могут экспрессироваться в растениях при высоких уровнях и без модификации, низкий уровень экспрессии в трансгенных растениях может быть обусловлен нуклеотидными последовательностями микроорганизмов, имеющими кодоны, которые не являются предпочтительными для растений. Как известно из уровня техники, для живых организмов характерны определенные предпочтения в отношении частоты использования кодонов, и кодоны нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем изобретении, могут быть изменены в соответствии с предпочтениями для растений, при этом с сохранением аминокислот, кодируемых ими. Кроме того, в данной области техники известно, что высокий уровень экспрессии в растениях, например, растениях кукурузы, лучше всего достигается в случае кодирующих последовательностей, которые характеризуются по меньшей мере приблизительно 35% содержанием GC, или по меньшей мере приблизительно 45%, или по меньшей мере приблизительно 50% или по меньшей мере приблизительно 60%. Микробные последовательности нуклеотидов, которые имеют низкое содержание GC, могут плохо экспрессироваться в растениях. Хотя определенные нуклеотидные последовательности могут надлежащим образом экспрессироваться как в видах однодольных, так и двудольных растений, последовательности можно модифицировать с учетом предпочтений в отношении кодонов и предпочтений в отношении содержания GC для однодольных растений или двудольных растений, поскольку было показано, что эти предпочтения отличаются (Murray et al. Nucl. Acids Res. 17:477-498 (1989)). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления нуклеотидную последовательность модифицируют для удаления неправильных сайтов сплайсинга, которые могут вызывать усечение транскрипта. Такие модификации нуклеотидных последовательностей можно выполнить с применением хорошо известных методик сайт-направленного мутагенеза, ПЦР и конструирования синтетических генов с

помощью способов, описанных, например, в патентах США №№ 5625136; 5500365 и 6013523.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает синтетические кодирующие последовательности или полинуклеотиды, полученные  
5 согласно процедуре, раскрытой в патенте США № 5 625 136. В этой процедуре применяют предпочтительные для маиса кодоны, т. е. один кодон, который чаще всего кодирует данную аминокислоту в маисе. Предпочтительный для маиса кодон, кодирующий конкретную аминокислоту, может быть определен, например, на основании известных последовательностей генов маиса. Например, данные о частоте  
10 использования кодонов у маиса для 28 генов из растений маиса находятся в MurRAY et al., *Nucleic Acids Research* 17:477-498 (1989). Известно, что кодоны, оптимизированные для экспрессии в растении одного вида, также будут функционировать в растениях других видов, но, вероятно, не в той же степени, как в виде растения, для которого кодоны были оптимизированы. Подобным образом нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы для экспрессии в любом растении. Следует понимать, что  
15 вся нуклеотидная последовательность или любая ее часть могут быть оптимизированными или синтетическими. То есть полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность, которая частично является нативной последовательностью и частично является последовательностью с оптимизированными  
20 кодонами.

В иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой выделенный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный полинуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности характеризуются по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%,  
25 или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,1%, или по меньшей мере 99,2%, или по меньшей мере 99,3%, или по меньшей мере 99,4%, или по меньшей мере 99,5%, или по меньшей мере 99,6%, или по меньшей мере 99,7%, или по меньшей мере 99,8%, или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: от 4 до 9. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает любую из SEQ ID NO:4-9.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой, содержащей, по сути состоящей из или состоящей из кодирующей последовательности, которая кодирует сконструированный белок по настоящему изобретению, являющийся токсичным для вредителя, относящегося к чешуекрылым. Промоторы могут включать, например, конститутивные, индуцируемые, временно регулируемые, регулируемые развитием, химически регулируемые, тканепредпочтительные и/или тканеспецифические промоторы. В конкретных аспектах промотор, применимый в настоящем изобретении, представляет собой промотор, способный инициировать транскрипцию нуклеотидной последовательности в растительной клетке, например, в клетке однодольного (например, маиса или риса) или двудольного (например, сои, хлопчатника) растения.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный промотор является промотором, экспрессируемым в растении (например, экспрессируемым в однодольном или экспрессируемым в двудольном). Например, без ограничения промотор, обеспечивающий экспрессию в растении, может быть выбран из группы промоторов, состоящей из промотора убиквитина, вируса, поражающего цеструм оранжевый, TgrA кукурузы, OsMADS 6, гистона H3 маиса, 5'-UTR гена 9 бактериофага T3, сахарозосинтетазы 1 кукурузы, алкогольдегидрогеназы 1 кукурузы, светособирающего комплекса кукурузы, белка теплового шока кукурузы, mtl маиса, малой субъединицы RuBP-карбоксилазы гороха, актина риса, циклофилина риса, маннопинсинтазы Ti-плазмиды, нопалинсинтазы Ti-плазмиды, халкон-изомеразы петунии, богатого глицином белка 1 бобов, пататина картофеля, лектина, 35S CaMV и малой субъединицы S-E9 RuBP-карбоксилазы.

Хотя, как было показано, многие промоторы из двудольных растений функционируют у однодольных и наоборот, в некоторых вариантах осуществления для экспрессии в двудольных растениях выбирают промоторы двудольных, а для экспрессии в однодольных растениях выбирают промоторы однодольных. Однако не существует каких-либо ограничений в отношении происхождения выбранных промоторов; при этом достаточно, чтобы они являлись функциональными в отношении управления экспрессией нуклеотидных последовательностей в требуемой клетке.

Выбор промотора может меняться в зависимости от временных и пространственных требований для экспрессии, а также в зависимости от клетки-хозяина, подлежащей трансформации. Таким образом, например, экспрессия нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению может

осуществляться в любом растении и/или части растения (например, в листьях, в цветоножках или стеблях, в колосьях, в соцветиях (например, колосья, метелки, початки и др.), в корнях, семенах и/или проростках и т. п.). Например, когда желательна экспрессия в конкретной ткани или органе, можно применять

5 тканеспецифический или тканепредпочтительный промотор (например, корнеспецифический/предпочтительный промотор). Например, если экспрессия в определенной ткани или органе нежелательна, можно использовать неактивный в ткани промотор. В некоторых вариантах осуществления представлен "неактивный в пыльце"

10 промотор, который приводит к низкой или вообще не выявляемой экспрессии гена в пыльце целевого вида растения. В отличие от этого, если желательной является экспрессия в ответ на стимул, можно применять промотор, индуцируемый определенными стимулами или химическими веществами. Если желательной является постоянная экспрессия на относительно стабильном уровне во всех клетках растения, может быть выбран конститутивный промотор.

15 Промоторы, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничений промоторы, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности конститутивно, промоторы, которые управляют экспрессией при индукции, и промоторы, которые управляют экспрессией тканеспецифически или специфически в отношении стадии развития. Эти различные типы промоторов хорошо

20 известны из уровня техники.

Подходящие конститутивные промоторы включают, например, промотор 35S CaMV (Odell et al., Nature 313:810-812, 1985); промотор At6669 Arabidopsis (см. публикацию согласно РСТ № W004081173A2); промотор Ubi 1 маиса (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); актина риса (McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); 19S CaMV (Nilsson et al., Physiol. Plant 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., Plant J November; 2(6):837-44, 1992); убиквитина (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992); циклофилина риса (Buchholz et al., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994); гистона H3 маиса (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992); актина 2 (An et al., Plant J. 10(1):107-121, 1996),

30 конститутивный промотор CT2 корневого кончика (заявка согласно РСТ № IL/2005/000627) и синтетический Super MAS (Ni et al., The Plant Journal 7: 661-76, 1995). Другие конститутивные промоторы включают описанные в патентах США №№ 5659026, 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463 и 5608142.

Тканеспецифическими или тканепредпочтительными промоторами, применимыми для экспрессии полипептидов по настоящему изобретению в растениях, необязательно в маисе, включают те, которые управляют экспрессией в корне, сердцевине, листе или пыльце. Подходящие тканеспецифические промоторы включают

5 без ограничения специфические для листьев промоторы [такие, которые описаны, например, в Yamamoto et al., *Plant J.* 12:255-265, 1997; Kwon et al., *Plant Physiol.* 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., *Plant Cell Physiol.* 35:773-778, 1994; Gotor et al., *Plant J.* 3:509-18, 1993; Orozco et al., *Plant Mol. Biol.* 23:1129-1138, 1993; и Matsuoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9586-9590, 1993], предпочтительные для семени

10 промоторы (например, из семяспецифических генов; Simon, et al., *Plant Mol. Biol.* 5. 191, 1985; Scofield, et al., *J. Biol. Chem.* 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., *Plant Mol. Biol.* 14: 633, 1990), промоторы альбумина из бразильского ореха (Pearson' et al., *Plant Mol. Biol.* 18: 235-245, 1992), легумина (Ellis, et al. *Plant Mol. Biol.* 10: 203-214, 1988), глютелина (Takaiwa, et al., *Mol. Gen. Genet.* 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., *FEBS Letts.* 221: 43-47, 1987), зеина (Matzke et al., *Plant Mol Biol*, 143).323-32 1990), napA (Stalberg, et al., *Planta* 199: 515-519, 1996), SPA пшеницы (Albanietal, *Plant Cell*, 9: 171-184, 1997), олеозина подсолнечника (Cummins, et al., *Plant Mol. Biol.* 19: 873-876, 1992)],

15 специфические для эндосперма промоторы (например, LMW и HMW пшеницы, глютенина-1 (*Mol Gen Genet* 216:81-90, 1989; *NAR* 17:461-2), глиадинов a, b и g пшеницы (*EMBOJ*:1409-15, 1984), промотор *ltrl* ячменя, гордеина B1, C, D ячменя (*Theor Appl Gen* 98:1253-62, 1999; *Plant J* 4:343-55, 1993; *Mol Gen Genet* 250:750-60, 1996), DOF ячменя (Mena et al., *The Plant Journal*, 116(1): 53-62, 1998), *Biz2* (EP99106056.7), синтетический промотор (Vicente-Carbajosa et al., *Plant J.* 13: 629-640, 1998), промотор проламина NRP33 риса, глобулина *Glb-1* риса (Wu et al., *Plant Cell*

20 *Physiology* 39(8) 885-889, 1998), альфа-глобулина REB/OHP-1 риса (Nakase et al. *Plant Mol. Biol.* 33: 513-S22, 1997), PP ADP-глюкозы риса (*Trans Res* 6:157-68, 1997), промотор гена семейства ESR маиса (*Plant J* 12:235-46, 1997), гамма-кафирина сорго (*Plant Mol. Biol* 32:1029-35, 1996)], специфические для зародышей промоторы (например, OSH1 риса; Sato et al., *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma of al, *Plant Mol. Biol.* 39:257-71, 1999), олеозина риса (Wu et at, *J. Biochem.*, 123:386, 1998), специфические для цветков промоторы, например, *AtPRP4*, халкон-синтазы (*chsA*) (Van der Meer, et al., *Plant Mol. Biol.* 15, 95-109, 1990), *LAT52* (Twell et al., *Mol. Gen Genet.* 217:240-245; 1989), *apetala-3* и промоторы, специфические

30

для репродуктивных тканей растений (например, промоторы OsMADS; публикация патента США № 2007/0006344).

Примеры промоторов, подходящих для предпочтительной экспрессии в зеленой ткани, включают в себя множество промоторов, которые осуществляют регуляцию генов, участвующих в фотосинтезе, и многие из них были клонированы как из  
5  
одногодольных, так и из двудольных. Одним из таких промоторов является промотор PERC гена фосфоенолкарбоксилазы маиса (Hudspeth & Grula, Plant Molec. Biol. 12:579-589 (1989)). Другим промотором специфической для корня экспрессии является промотор, описанный de Framond (FEBS 290:103-106 (1991) или в патенте США  
10 № 5466785). Другой промотор, применимый в настоящем изобретении, представляет собой специфический для стебля промотор, описанный в патенте США № 5625136, который в естественных условиях управляет экспрессией гена *trpA* маиса.

Кроме того, могут применяться промоторы, функционирующие в пластидах. Неограничивающие примеры таких промоторов включают промотор 5'-UTR гена 9  
15 бактериофага T3 и другие промоторы, раскрытые в патенте США № 7579516. Другие промоторы, применимые в настоящем изобретении, включают без ограничения промотор малой субъединицы S-E9 RuBP-карбоксилазы и промотор гена ингибитора трипсина Кунитца (*Kti3*).

В некоторых вариантах осуществления можно применять индуцируемые промоторы. Таким образом, например, промоторы, регулируемые химическими  
20 веществами, можно применять для модуляции экспрессии гена в растении путем применения экзогенного химического регулятора. Регуляция экспрессии нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению посредством промоторов, регулируемых химическими веществами, обеспечивает синтез полипептидов по  
25 настоящему изобретению только тогда, когда культурные растения обрабатывают индуцирующими химическими веществами. В зависимости от цели промотор может представлять собой промотор, индуцируемый химическим веществом, где применение химического вещества индуцирует экспрессию гена, или промотор, подавляемый химическим веществом, где применение химического вещества подавляет экспрессию  
30 гена. Примеры такой технологии химической индукции экспрессии генов подробно описаны в публикации заявки EP 0332104 и патенте США № 5614395.

Промоторы, индуцируемые химическими веществами, известны из уровня техники и включают без ограничения промотор In2-2 маиса, который активируется антидотами бензолсульфонамидных гербицидов, промотор GST маиса, который

активируется гидрофобными электрофильными соединениями, применяемыми в качестве довсходовых гербицидов, промотор PR-1а табака, который активируется салициловой кислотой (например, системы PR1а), стероидные стероидзависимые промоторы (см., например, промотор, индуцируемый глюкокортикоидами, в Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10421-10425 и McNellis et al. (1998) Plant J. 14, 247-257), промоторы, индуцируемые тетрациклинами и подавляемые тетрациклинами (см., например, Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227, 229-237 и патенты США №№ 5814618 и 5789156), промоторы системы Lac-репрессора, промоторы системы, индуцируемой медью, промоторы системы, индуцируемой салицилатом (например, системы PR1а), промоторы, индуцируемые глюкокортикоидами (Aoyama et al. (1997) Plant J. 11:605-612), и промоторы системы, индуцируемой экдизоном.

Другие неограничивающие примеры индуцируемых промоторов включают промоторы, индуцируемые АВА и тургорным давлением, промотор гена белка, связывающегося с ауксином (Schwob et al. (1993) Plant J. 4:423-432), промотор UDP-глюкозофлавоноидгликозилтрансферазы (Ralston et al. (1988) Genetics 119:185-197), промотор ингибитора протеиназы MPI (Cordero et al. (1994) Plant J. 6:141-150) и промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Kohler et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29:1293-1298; Martinez et al. (1989) J. Mol. Biol. 208:551-565 и Quigley et al. (1989) J. Mol. Evol. 29:412-421). Также включены системы, индуцируемые бензолсульфонамидом (патент США № 5364780) и индуцируемые спиртами (публикации Международных патентных заявок №№ WO 97/06269 и WO 97/06268), и промоторы гена глутатион-S-трансферазы. Аналогично можно применять любой из индуцируемых промоторов, описанных в Gatz (1996) Current Opinion Biotechnol. 7:168-172 и Gatz (1997) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108. Другие химическими индуцируемые промоторы, применимые для управления экспрессией нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению в растениях, раскрыты в патенте США № 5614395. Химическая индукция экспрессии генов также подробно изложена в EP 0332104 (от Ciba-Geigy) и патенте США № 5614395.

Другая категория промоторов, применимых в настоящем изобретении, представляет собой промоторы, индуцируемые ранением. Примеры промоторов этого типа включают описанные Stanford et al. Mol. Gen. Genet. 215:200-208 (1989), Xu et al. Plant Molec. Biol. 22:573-588 (1993), Logemann et al. Plant Cell 1:151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22:783-792 (1993), Firek et al. Plant Molec. Biol. 22:129-142 (1993) и Warner et al. Plant J. 3:191-201 (1993).

В некоторых вариантах осуществления представлен рекомбинантный вектор, который содержит полинуклеотид, собранный полинуклеотид, молекулу нуклеиновой кислоты или кассету экспрессии по настоящему изобретению. Некоторые векторы для применения в трансформации растений и других организмов известны из уровня техники. В других вариантах осуществления неограничивающие примеры вектора включают плазмидный, космидный, фагмидный вектор, вектор на основе искусственной хромосомы, фаговый или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой растительный вектор, например, для применения при трансформации растений. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой бактериальный вектор, например, для применения при трансформации бактерий. Подходящие векторы для растений, бактерий и других организмов известны в данной области техники.

Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к кассетам экспрессии, сконструированным для экспрессии полинуклеотидов и молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии содержит молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере контрольную последовательность, функционально связанную с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью, например, нуклеотидной последовательностью, кодирующей инсектицидный белок по настоящему изобретению. Таким образом, например, в кассетах экспрессии для экспрессии в растении, части растения или растительной клетке предусмотрены промоторы растений, функционально связанные с нуклеотидными последовательностями, подлежащими экспрессии.

Кассета экспрессии, содержащая представляющий интерес полинуклеотид, может быть химерной, что означает, что по меньшей мере один из ее компонентов является гетерологичным по отношению по меньшей мере к одному из ее других компонентов. Кассета экспрессии также может представлять собой таковую, которая встречается в естественных условиях, но которая была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Однако, как правило, кассета экспрессии является гетерологичной по отношению к хозяину, т. е. конкретная последовательность нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии не встречается в клетке-хозяине в естественных условиях, а должна быть введена в клетку-хозяина или предка клетки-хозяина с помощью события трансформации.

В дополнение к промоторам, функционально связанным с нуклеотидными последовательностями по настоящему изобретению, кассета экспрессии по настоящему изобретению также может включать другие регуляторные последовательности.

5 Регуляторные последовательности включают без ограничения энхансеры, интроны, лидерные последовательности, регулирующие трансляцию, сигналы терминации и сигнальные последовательности полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии также может содержать полинуклеотиды, которые кодируют другие требуемые признаки, помимо раскрытых сконструированных белков. Такие кассеты экспрессии, содержащие

10 пакетированные признаки, можно применять для создания растений, частей растений или растительных клеток, характеризующихся требуемым фенотипом с пакетированными признаками (т. е. молекулярное пакетирование). Такие пакетированные комбинации в растениях также можно создавать с помощью других способов, включая без ограничения кроссбридинг растений с помощью любой

15 традиционной методики. При "пакетировании" путем генетической трансформации растений представляющие интерес нуклеотидные последовательности можно комбинировать в любой момент времени и в любом порядке. Например, трансгенное растение, характеризующееся одним или несколькими требуемыми признаками, можно применять в качестве мишени для введения дополнительных признаков посредством

20 последующей трансформации. Дополнительные нуклеотидные последовательности можно вводить согласно протоколу котрансформации одновременно с нуклеотидной последовательностью, молекулой нуклеиновой кислоты, конструкцией нуклеиновой кислоты или композицией по настоящему изобретению, обеспечиваемыми любой комбинацией кассет экспрессии. Например, если будут вводить две нуклеотидные

25 последовательности, то их можно встроить в отдельные кассеты (транс-положение), или их можно встроить в одну кассету (цис-положение). Экспрессия полинуклеотидов может управляться одним и тем же промотором или различными промоторами. Кроме того, общеизвестно, что полинуклеотиды можно "пакетировать" в требуемом местоположении генома с применением сайт-специфической нуклеазы или системы

30 рекомбинации (например, FRT/Flp, Cre/Lox, TALE-эндонуклеаз, нуклеаз с цинковыми пальцами, CRISPR/Cas и родственных технологий). См., патенты США №№ US7214536, US8921332, US8765448, US5527695, US5744336, US5910415, US6110736, US6175058, US6720475, US6455315, US6458594 и публикации заявок на

патент США №№ US2019093090, US2019264218, US2018327785, US2017240911, US2016208272, US2019062765.

Кассета экспрессии также может содержать дополнительную последовательность, кодирующую один или несколько полипептидов или молекул двухнитевой РНК (dsRNA), обеспечивающих представляющие интерес агрономические признаки, которые преимущественно приносят пользу компании-производителю семян, сельхозпроизводителю или переработчику зерна. Представляющий интерес полипептид может быть любым полипептидом, кодируемым представляющей интерес нуклеотидной последовательностью. Неограничивающие примеры представляющих интерес полипептидов, которые подходят для продуцирования в растениях, включают полипептиды, приводящие к важным с агрономической точки зрения признакам, таким как устойчивость к гербицидам (также иногда называется “толерантностью к гербицидам”), устойчивость к вирусам, устойчивость к патогенным бактериям, устойчивость к насекомым, устойчивость к нематодам или устойчивость к грибам. См., например, патенты США №№ 5569823; 5304730; 5495071; 6329504 и 6337431. Полипептид также может представлять собой полипептид, который увеличивает мощность или урожайность растения (включая признаки, которые дают возможность растению произрастать при различных температурах, почвенных условиях и уровнях солнечного света и атмосферных осадков), или полипептид, который дает возможность идентифицировать растение, проявляющее представляющий интерес признак (например, селективируемый маркер, цвет семенной оболочки и т. д.). Разнообразные представляющие интерес полипептиды, а также способы введения этих полипептидов в растение описаны, например, в патентах США №№ 4761373; 4769061; 4810648; 4940835; 4975374; 5013659; 5162602; 5276268; 5304730; 5495071; 5554798; 5561236; 5569823; 5767366; 5879903, 5928937; 6084155; 6329504 и 6337431; а также в публикации заявки на патент США № 2001/0016956.

В некоторых вариантах осуществления также можно применять полинуклеотиды, придающие устойчивость/толерантность к гербициду, ингибирующему конус нарастания или меристему, такому как имидазолинон или сульфонилмочевина. Иллюстративные полинуклеотиды из этой категории кодируют мутантные ферменты ALS и AHAS, которые описаны, например, в патентах США №№ 5767366 и 5928937. Патенты США №№ 4761373 и 5013659 относятся к растениям, устойчивым к различным имидазолиноновым или сульфонамидным гербицидам. Патент США № 4975374 относится к растительным клеткам и растениям, содержащим

нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантную глутаминсинтетазу (GS), устойчивую к ингибированию гербицидами, которые, как известно, ингибируют GS, например, фосфинотрицин и метионинсульфоксимин. В патенте США № 5162602 раскрыты растения, устойчивые к ингибированию гербицидами на основе циклогександиона и арилоксифеноксипропановой кислоты. Устойчивость придает измененная ацетил-коэнзим А-карбоксилаза (АССаза).

Полипептиды, кодируемые нуклеотидными последовательностями, придающими устойчивость к глифосату, также подходят для настоящего изобретения. См., например, патент США № 4940835 и патент США № 4769061. В патенте США № 5554798 раскрыты трансгенные растения маиса, устойчивые к глифосату, устойчивость которым придает ген измененной 5-енолпирувил-3-фосфошикиматсинтазы (EPSP).

Также подходят полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к фосфоновым соединениям, таким как глюфосинат аммония или фосфинотрицин, а также пиридинокси- или феноксипропионовым кислотам и циклогексанонам. См. европейскую патентную заявку № 0242246. См. также патенты США №№ 5879903, 5276268 и 5561236.

Другие подходящие полинуклеотиды включают полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к гербицидам, ингибирующим фотосинтез, таким как триазин и бензонитрил (ген нитрилазы). См. патент США № 4810648. Дополнительные подходящие полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к гербицидам, включают полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к 2,2-дихлорпропионовой кислоте, сетоксидиму, галоксифопу, имидазолиноновым гербицидам, сульфонилмочевинным гербицидам, триазолопиримидиновым гербицидам, s-триазиновым гербицидам и бромоксинилу. Также подходят полинуклеотиды, придающие устойчивость к ингибиторам фермента protox, или которые обеспечивают повышенную устойчивость к заболеваниям растений; повышенную толерантность к неблагоприятным условиям окружающей среды (видам абиотического стресса), в том числе без ограничения к засухе, чрезмерному охлаждению, чрезмерному нагреву, или чрезмерной засоленности почвы, или экстремальной кислотности или щелочности; и изменения строения или развития растений, в том числе изменения сроков развития. См., например, публикацию заявки на патент США № 2001/0016956 и патент США № 6084155.

Дополнительные подходящие полинуклеотиды включают таковые, кодирующие пестицидные (например, инсектицидные) полипептиды. Эти полипептиды могут быть

получены в количествах, достаточных для контроля, например, насекомых-вредителей (т. е. в количествах, обеспечивающих контроль насекомых). Считается, что количество продуцируемого в растении пестицидного полипептида, необходимое для контроля насекомых или других вредителей, может варьировать в зависимости от сорта, типа вредителя, факторов окружающей среды и т. п. Полинуклеотиды, применимые для придания дополнительной устойчивости к насекомым или вредителям, включают, например, полинуклеотиды, кодирующие токсины, идентифицированные в организмах *Bacillus*. Были клонированы полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие белки Cry *Bacillus thuringiensis* (Bt) из нескольких подвидов, и было обнаружено, что рекомбинантные клоны токсичны для личинок насекомых, относящихся к чешуекрылым, двукрылым и/или жесткокрылым. Примеры таких инсектицидных белков Bt включают белки Cry, такие как Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry3A, Cry9A, Cry9B, Cry9C и т. п., а также вегетативные инсектицидные белки, такие как Vip1, Vip2, Vip3 и т. п. Полный перечень белков Bt можно найти во всемирной сети Интернет в базе данных номенклатуры токсинов *Bacillus thuringiensis*, поддерживаемой университетом Сассекса (см. также Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный полипептид представляет собой инсектицидный полипептид, полученный из источника, отличного от Bt, включая без ограничения альфа-амилазу, пероксидазу, холестериноксидазу, пататин, протеазу, ингибитор протеазы, уреазу, ингибитор альфа-амилазы, порообразующий белок, хитиназу, лектин, сконструированное антитело или фрагмент антитела, инсектицидный белок *Bacillus cereus*, инсектицидный белок *Xenorhabdus* spp. (такого как *X. nematophila* или *X. bovienii*), инсектицидный белок *Photorhabdus* spp. (такого как *P. luminescens* или *P. asymobiotica*), инсектицидный белок *Brevibacillus* spp. (такого как *B. laterosporous*), инсектицидный белок *Lysinibacillus* spp. (такого как *L. sphearicus*), инсектицидный белок *Chromobacterium* spp. (такого как *C. subsugae* или *C. piscinae*), инсектицидный белок *Yersinia* spp. (такого как *Y. entomophaga*), инсектицидный белок *Paenibacillus* spp. (такого как *P. propylaea*), инсектицидный белок *Clostridium* spp. (такого как *C. bifermentans*), *Pseudomonas* spp. (такого как *P. fluorescens*) и лигнин.

Полипептиды, подходящие для продуцирования в растениях, дополнительно включают такие полипептиды, которые улучшают превращение собранных растений или частей растений в коммерчески применимый продукт или иным образом

содействуют ему, включая, например, увеличенное или измененное содержание или распределение углеводов, улучшенные свойства сбраживаемости, повышенное содержание масла, повышенное содержание белка, улучшенную усвояемость или повышенное содержание нутрицевтиков, например, повышенное содержание фитостерола, повышенное содержание токоферола, повышенное содержание станола или повышенное содержание витаминов. Представляющие интерес полипептиды также включают, например, полипептиды, приводящие к снижению содержания нежелательного компонента в собранном урожае, например, фитиновой кислоты или расщепляющих сахара ферментов, или способствующие этому. Под “приводящим” или “способствующим” подразумевается, что представляющий интерес полипептид может прямо или опосредованно способствовать присутствию представляющего интерес признака (например, увеличение расщепления целлюлозы при применении гетерологичного фермента целлюлазы).

В некоторых вариантах осуществления полипептид способствует улучшению усвояемости еды или корма. Ксиланазы представляют собой ферменты, расщепляющие гемицеллюлозу, которые усиливают разрушение клеточных стенок растений, что приводит к улучшенному использованию питательных веществ растения животным. Это приводит к увеличению темпов роста и конверсии корма. Также может снижаться вязкость кормов, содержащих ксилан. Гетерологичное продуцирование ксиланаз в растительных клетках также может облегчать превращение лигноцеллюлозы в сбраживаемые сахара при промышленной переработке.

Многочисленные ксиланазы из грибных и бактериальных микроорганизмов были идентифицированы и охарактеризованы (см., например, патент США № 5437992; Coughlin et al. (1993) “Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases” Espoo; Souminen and Reinikainen, eds. (1993) Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:125-135; публикацию патента США № 2005/0208178 и публикацию согласно PCT WO 03/16654). В частности, три специфичные ксиланазы (XYL-I, XYL-II и XYL-III) были идентифицированы у *T. reesei* (Tenkanen et al. (1992) Enzyme Microb. Technol. 14:566; Torronen et al. (1992) Bio/Technology 10:1461; и Xu et al. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718).

В других вариантах осуществления полипептид, применимый в случае настоящего изобретения, может представлять собой расщепляющий полисахариды фермент. Растения по настоящему изобретению, продуцирующие такой фермент, могут

быть применимы для получения, например, сбраживаемого сырья для биологической переработки. В некоторых вариантах осуществления ферменты, применимые для процесса сбраживания, включают альфа-амилазы, протеазы, пуллулазы, изоамилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, ксиланазы, циклодекстрингликозилтрансферазы, липазы, фитазы, лакказы, оксидазы, эстеразы, кутиназы, фермент, гидролизующий гранулированный крахмал, и другие глюкоамилазы.

Расщепляющие полисахариды ферменты включают расщепляющие крахмал ферменты такие как  $\alpha$ -амилазы (ЕС 3.2.1.1), глюкуронидазы (Е.С. 3.2.1.131); экзо-1,4- $\alpha$ -D-глюканы, такие как амилоглюкозидазы и глюкоамилаза (ЕС 3.2.1.3),  $\beta$ -амилазы (ЕС 3.2.1.2),  $\alpha$ -глюкозидазы (ЕС 3.2.1.20) и другие экзоамилазы; крахмал-деветвящие ферменты, такие как а) изоамилаза (ЕС 3.2.1.68), пуллулаза (ЕС 3.2.1.41) и т. п.; б) целлюлазы, такие как экзо-1,4-3-целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91), экзо-1,3- $\beta$ -D-глюканы (ЕС 3.2.1.39),  $\beta$ -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21); с) L-арабиназы, такие как эндо-1,5- $\alpha$ -L-арабиназа (ЕС 3.2.1.99),  $\alpha$ -арабинозидазы (ЕС 3.2.1.55) и т. п.; d) галактаназы, такие как эндо-1,4- $\beta$ -D-галактаны (ЕС 3.2.1.89), эндо-1,3- $\beta$ -D-галактаны (ЕС 3.2.1.90),  $\alpha$ -галактозидаза (ЕС 3.2.1.22),  $\beta$ -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) и т. п.; e) маннаны, такие как эндо-1,4- $\beta$ -D-маннаны (ЕС 3.2.1.78),  $\beta$ -маннозидаза (ЕС 3.2.1.25),  $\alpha$ -маннозидаза (ЕС 3.2.1.24) и т. п.; f) ксиланазы, такие как эндо-1,4- $\beta$ -ксиланы (ЕС 3.2.1.8),  $\beta$ -D-ксилозидаза (ЕС 3.2.1.37), 1,3- $\beta$ -D-ксиланы и т. п.; и g) другие ферменты, такие как  $\alpha$ -L-фукозидаза (ЕС 3.2.1.51),  $\alpha$ -L-рамнозидаза (ЕС 3.2.1.40), леваны (ЕС 3.2.1.65), инулиназа (ЕС 3.2.1.7) и т. п. В одном варианте осуществления  $\alpha$ -амилаза представляет собой синтетическую  $\alpha$ -амилазу Amy797E, описанную в патенте США № 8093453, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Дополнительные ферменты, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают протеазы, такие как протеазы грибов и бактерий. Протеазы грибов включают без ограничений протеазы, полученные из *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* и *Rhizopus*, как, например, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* и *M. miehei*. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению могут представлять собой ферменты целлобиогидролазы (CBH) (ЕС 3.2.1.91). В одном варианте осуществления фермент целлобиогидролаза может представлять собой СВН1 или СВН2.

Другие ферменты, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения гемицеллюлазы, такие как манназы и арабинофуранозидазы

(ЕС 3.2.1.55); лигниназы; липазы (например, Е.С. 3.1.1.3), глюкозооксидазы, пектиназы, ксиланазы, трансглюкозидазы, альфа-1,6-глюкозидазы (например, Е.С. 3.2.1.20); эстеразы, такие как эстераза феруловой кислоты (ЕС 3.1.1.73) и ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72) и кутиназы (например, Е.С. 3.1.1.74).

5 Молекулы двухнитевой РНК, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения молекулы, которые супрессируют целевые гены у насекомых. Предполагается, что используемое в данном документе словосочетание "супрессия гена" в совокупности относится к любому из хорошо  
10 известных способов снижения уровней белка, продуцируемого в результате транскрипции гена в мРНК и последующей трансляции мРНК. Также подразумевается, что супрессия гена означает снижение экспрессии белка с гена или кодирующей последовательности, в том числе посттранскрипционную супрессию гена и транскрипционную супрессию. Посттранскрипционная супрессия гена обусловлена гомологией между всей или частью мРНК, транскрибированной с гена или  
15 кодирующей последовательности, являющихся мишенями для супрессии, и соответствующей двухнитевой РНК, используемой для супрессии, и означает значимое и измеряемое снижение количества доступной мРНК, имеющейся в клетке для связывания рибосомами. Транскрибированная РНК может находиться в смысловой ориентации для осуществления так называемой косупрессии, в антисмысловой  
20 ориентации для осуществления так называемой антисмысловой супрессии, или в обеих ориентациях с образованием dsRNA для осуществления так называемой РНК-интерференции (RNAi). Транскрипционная супрессия обусловлена присутствием в клетке dsRNA, обеспечивающего супрессию гена средства, характеризующегося значительной идентичностью последовательности с промоторной последовательностью  
25 ДНК или комплементарной ей нитью, для осуществления так называемой супрессии промотора в транс-положении. Супрессия гена может быть эффективной в отношении нативного гена растения, ассоциированного с признаком, например, для обеспечения в растениях сниженных уровней белка, кодируемого нативным геном, или повышенными или сниженными уровнями измененного метаболита. Супрессия гена также может быть  
30 эффективной в отношении целевых генов во вредителях растений, которые могут поглощать или контактировать с растительным материалом, содержащим средства для обеспечения супрессии гена, специально сконструированные для подавления или супрессии экспрессии одной или нескольких гомологичных или комплементарных последовательностей в клетках вредителя. Такие гены-мишени для супрессии могут

кодировать жизненно важный белок, предполагаемая функция которого выбрана из группы, состоящей из формирования мышц, образования ювенильного гормона, регуляции ювенильного гормона, регуляции и транспорта ионов, синтеза пищеварительных ферментов, поддержания мембранного потенциала клетки, биосинтеза аминокислот, расщепления аминокислот, сперматогенеза, синтеза феромонов, восприятия феромонов, формирования антенн, формирования крыльев, формирования конечностей, развития и дифференцировки, формирования яиц, созревания личинок, образования пищеварительных ферментов, синтеза гемолимфы, поддержания постоянства состава гемолимфы, передачи нервных импульсов, клеточного деления, энергетического метаболизма, дыхания и апоптоза.

#### Трансгенные клетки, растения, части растений, семена

В некоторых аспектах настоящее изобретение, кроме того, относится к трансгенным клеткам, растениям, частям растений и семени, содержащим инсектицидные белки или нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к отличной от человеческой клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, молекулу нуклеиновой кислоты, кассету экспрессии, вектор или полипептид по настоящему изобретению. Трансгенная клетка-хозяин, отличная от клетки человека, может включать без ограничения растительную клетку (в том числе клетку однодольного растения и/или клетку двудольного растения), дрожжевую клетку, бактериальную клетку или клетку насекомого. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления представлена бактериальная клетка, которая выбрана из рода *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Pasteuria*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* или *Alcaligenes*. Таким образом, например, в качестве средств для биологического контроля насекомых можно получать раскрытые сконструированные инсектицидные белки путем экспрессии полинуклеотида, кодирующего их, в бактериальной клетке. Например, в некоторых вариантах осуществления представлена клетка *Bacillus thuringiensis*, содержащая полинуклеотид, кодирующий инсектицидный белок по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления трансгенная растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения или клетку однодольного растения. В дополнительных вариантах осуществления клетка двудольного растения представляет

собой клетку сои, клетку подсолнечника, клетку томата, клетку культурной разновидности капусты, клетку хлопчатника, клетку сахарной свеклы и клетку табака.

В дополнительных вариантах осуществления клетка однодольного растения представляет собой клетку ячменя, клетку маиса, клетку овса, клетку риса, клетку сорго, клетку сахарного тростника и клетку пшеницы. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к совокупности клеток двудольных растений или клеток однодольных растений, содержащих полинуклеотид, экспрессирующий раскрытый подобный *Cry1B* или сконструированный инсектицидный белок. В некоторых вариантах осуществления клетки в совокупности расположены рядом с образованием апопласта, и их выращивают при естественном солнечном свете. В вариантах осуществления трансгенная растительная клетка не может регенерировать в целое растение.

В других вариантах осуществления по настоящему изобретению инсектицидный сконструированный белок по настоящему изобретению экспрессируется в высшем организме, например, растении. Такие трансгенные растения, экспрессирующие эффективные количества инсектицидного белка для контроля вредителей растений, таких как насекомые-вредители. Когда насекомое начинает кормиться на таком трансгенном растении, оно также поглощает экспрессируемый инсектицидный белок. Это может сдерживать насекомое от дальнейшего вгрызания в растительную ткань или даже может причинять вред насекомому или уничтожать его. В некоторых вариантах осуществления раскрытый полинуклеотид вставляют в кассету экспрессии, которая затем стабильно интегрируется в геном растения. В других вариантах осуществления полинуклеотид включен в непатогенный самореплицирующийся вирус.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансгенная растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид по настоящему изобретению, представляет собой клетку части растения, органа растения или растительной культуры (в каждом случае как описано в данном документе), включая без ограничения корень, лист, семя, цветок, плод, клетку пыльцы, орган или растительную культуру и т. п., или каллюсную клетку или культуру.

Трансгенные растение или растительная клетка, трансформированные в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой однодольное или двудольное растение или клетку однодольного или двудольного растения и включают без ограничения кукурузу (маис), сою, рис, пшеницу, ячмень, рожь, овес, сорго, просо, подсолнечник, сафлор, сахарную свеклу, хлопчатник, сахарный тростник, масличный

рапс, люцерну, табак, разновидности арахиса, овощные культуры, в том числе батат, фасоль, горох, цикорий, латук, кочанную капусту, цветную капусту, брокколи, репу, морковь, баклажан, огурец, редьку, шпинат, картофель, томат, спаржу, лук, чеснок, разновидности дыни, перец, сельдерей, тыкву крупноплодную, тыкву обыкновенную, цуккини, плодовые культуры, включая яблоню, грушу, айву, сливу, вишню, персик, нектарин, абрикос, землянику, виноград, малину, ежевику, ананас, авокадо, папайю, манго, банан и специализированные растения, такие как *Arabidopsis*, а также древесные растения, такие как хвойные и лиственные деревья. Предпочтительно растения по настоящему изобретению представляют собой культурные растения, такие как маис, сорго, пшеница, подсолнечник, томат, крестоцветные, разновидности перца, картофель, хлопчатник, рис, соя, сахарная свекла, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т. п.

После того как требуемый полинуклеотид был введен в конкретный вид растения путем трансформации, он может распространяться в пределах этого вида или переходить в другие сорта того же вида, в частности, включающие коммерческие сорта, с применением соответствующей методики, в том числе традиционных методик селекции.

Раскрытые инсектицидные белки могут функционировать в части растения, растительной клетке, органе растения, семени, собранном продукте, обработанном продукте или экстракте и т. п. в качестве средства для контроля насекомых. Другими словами, инсектицидные белки могут продолжать выполнять инсектицидную функцию, которая была характерна для него в трансгенном растении. Нуклеиновая кислота может функционировать с экспрессией инсектицидного белка. В качестве альтернативы кодированию инсектицидного белка по настоящему изобретению нуклеиновая кислота может функционировать с идентификацией трансгенных части растения, растительной клетки, органа растения, семени, собранного продукта, обработанного продукта или экстракта по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения или семя по настоящему изобретению являются гемизиготными в отношении полинуклеотида или кассеты экспрессии по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения или семя по настоящему изобретению являются гомозиготными в отношении полинуклеотида или кассеты экспрессии по настоящему изобретению.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают собранные продукты, полученные из трансгенных растений или их частей по настоящему изобретению, а также переработанный продукт, полученный из данных собранных продуктов. Собранный продукт может представлять собой целое растение или любую часть растения, описанные в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления неограничивающие примеры собранного продукта включают семя, плод, цветок или его часть (например, пыльник, рыльце и т. п.), лист, стебель и т. п. В других вариантах осуществления переработанный продукт включает без ограничения муку тонкого помола, муку грубого помола, масло, крахмал, крупу и т. п., полученные из собранного семени или другой части растения по настоящему изобретению, при этом указанное семя или другая часть растения содержит молекулу нуклеиновой кислоты/полинуклеотид/нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение представляет экстракт из трансгенного семени или трансгенного растения по настоящему изобретению, при этом экстракт содержит молекулу нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, нуклеотидную последовательность или инсектицидный белок по настоящему изобретению. Экстракты из растений или частей растений можно получить в соответствии с процедурами, хорошо известными в данной области техники (см. de la Torre et al., Food, Agric. Environ. 2(1):84-89 (2004); Guidet, Nucleic Acids Res. 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton et al., Food Agric. Immun. 12:153-164 (2000)). Такие экстракты можно применять, например, в способах обнаружения присутствия инсектицидного белка или полинуклеотида по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения, семя, собранный продукт, обработанный продукт или экстракт имеют повышенную активность в отношении одного или нескольких насекомым-вредителям (например, вредителя, относящегося к чешуекрылым, такого как кукурузная листовая совка) по сравнению с подходящим контролем, который не содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую инсектицидный белок по настоящему изобретению.

### Трансформация растений

Процедуры для трансформирования растений хорошо известны и общеприняты в данной области техники и подробно описаны в литературе. Неограничивающие примеры способов трансформации растений включают трансформацию с помощью

доставки нуклеиновых кислот, опосредованной бактериями (например, с помощью *Agrobacterium*), доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной карбидом кремния или вискерами с нуклеиновыми кислотами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной липосомами, микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную циклодекстринами, электропорацию, трансформацию, опосредованную наночастицами, обработку ультразвуком, инфльтрацию, поглощение нуклеиновых кислот, опосредованное PEG, а также любой другой электрический, химический, физический (механический) или биологический механизм, который приводит к введению нуклеиновой кислоты в растительную клетку, включая любую их комбинацию. Общие руководства по разнообразным способам трансформации растений, известным в данной области техники, включают Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 67-88) и Rakowoczy-Trojanowska (*Cell Mol Biol Lett* 7:849-858 (2002)).

Для трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, в целом подходят бинарные векторы или векторы, несущие по меньшей мере одну граничную последовательность T-DNA, тогда как для прямого переноса генов (например, с помощью бомбардировки частицами и т. п.) подходит любой вектор, и можно применять линейную ДНК, содержащую только представляющую интерес конструкцию. В случае прямого переноса генов можно применять трансформацию с помощью одного вида ДНК или котрансформацию (Schocher et al., *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)). В случае как прямого переноса генов, так и переноса, опосредованного *Agrobacterium*, трансформацию обычно (но необязательно) выполняют с селектируемым маркером, который может представлять собой средство для положительного отбора (например, фосфоманнозоизомеразы), которое обеспечивает устойчивость к антибиотику (например, канамицину, гигромицину или метотрексату) или гербициду (например, глифосату или глюфосинату). Однако выбор селектируемого маркера не является критически важным для настоящего изобретения.

Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, представляет собой способ, широко применяемый для трансформации растений в связи с высокой эффективностью трансформации и в связи с его широкой применимостью в отношении множества различных видов. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, как правило,

предполагает перенос бинарного вектора, несущего представляющую интерес чужеродную ДНК, в соответствующий штамм *Agrobacterium*, который может зависеть от набора генов *vir* штамма-хозяина *Agrobacterium*, расположенного либо на корезидентной Ti-плазмиде, либо в хромосоме (Uknes et al. (1993) *Plant Cell* 5:159-169).

5 Перенос рекомбинантного бинарного вектора в *Agrobacterium* можно выполнять с помощью процедуры трехродительского скрещивания с применением *Escherichia coli*, несущей рекомбинантный бинарный вектор, хелперного штамма *E.coli*, несущего плазмиду, которая способна мобилизовать рекомбинантный бинарный вектор в целевом штамме *Agrobacterium*. В качестве альтернативы рекомбинантный бинарный  
10 вектор можно переносить в *Agrobacterium* путем трансформации нуклеиновой кислоты (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

Двудольные растения, а также однодольные растения можно трансформировать с применением *Agrobacterium*. Способы трансформации риса, опосредованной *Agrobacterium*, включают хорошо известные способы трансформации риса, такие как  
15 описанные в любом из следующего: европейская патентная заявка EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены. В случае трансформации кукурузы предпочтительным способом является описанный или  
20 в Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996), или в Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены. Указанные способы также описаны в качестве примера в Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 и в  
25 *Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Нуклеиновые кислоты или конструкция, подлежащие экспрессии, предпочтительно клонируют в вектор, который является подходящим для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, например pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). *Agrobacteria*, трансформированные таким вектором, затем можно применять известным способом  
30 для трансформации растений, таких как растения, применяемые в качестве модели, такие как *Arabidopsis*, или сельскохозяйственных культур, таких как, в качестве примера, растения табака, например, посредством погружения истолченных листьев или нарубленных листьев в раствор с агробактериями и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens*

описана, например, Hagen and Willmitzer в Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 или известна, в частности, из F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; в Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

5           Растительный материал сои можно соответствующим образом трансформировать, а фертильные растения регенерировать множеством способов, которые широко известны специалисту в данной области техники. Например, фертильные морфологически нормальные трансгенные растения сои могут быть  
10           получены путем: 1) производства соматической эмбриогенетической ткани из, например, незрелой семядоли, гипокотыля или другой подходящей ткани; 2) трансформации путем бомбардировки частицами или инфицирования *Agrobacterium* и 3) регенерации растений. В одном пример, описанном в патенте США № 5024944, ткань семядоли вырезали из незрелых зародышей сои, предпочтительно с удаленной зародышевой осью, и культивировали на содержащей гормон среде с образованием  
15           соматического эмбрионного растительного материала. Данный материал трансформируют в плодоносящие трансгенные соевые растения с использованием, например, прямых способов ДНК, баллистической трансфекции покрытой ДНК или инфицирования *Agrobacterium*, культивированными на подходящей селективной среде и регенерированные, необязательно, также в постоянном присутствии селективного  
20           агента. Средствами для отбора могут быть антибиотики, такие как канамицин, гигромицин, или гербициды, такие как фосфинотрицин или глифосат, или, в качестве альтернативы, отбор может быть основан на экспрессии визуализируемого маркерного гена, такого как GUS. В качестве альтернативы, целевые ткани для трансформации включают меристематическую, а не соматическую эмбрионную ткань или  
25           необязательно представляют собой ткань цветка или образующую цветок ткань. Можно привести и другие примеры трансформации сои, например, с помощью физического способа доставки ДНК, такого как бомбардировка частицами (Finer and McMullen (1991) In Vitro Cell Dev. Biol. 27P:175-182; McCabe et al. (1988) Bio/technology 6:923-926), с помощью вискера (Khalafalla et al. (2006) African J. of Biotechnology 5:1594-1599), аэрозольного пучкового инжектора (патент США № 7001754) или с помощью  
30           способом опосредованной *Agrobacterium* доставки (Hinchee et al. (1988) Bio/Technology 6:915-922; патент США № 7002058; публикации патентной заявки США № 20040034889; публикации патентной заявки США № 20080229447; Paz et al. (2006) Plant Cell Report 25:206-213).

Трансгенные растения сои можно создавать с помощью ранее описанных бинарных векторов, содержащих селективируемые маркерные гены, с помощью различных способов трансформации. Например, вектор применяют для трансформации мишеней, представляющих собой незрелые семена, как описано (см., например, публикацию патентной заявки США № 20080229447), с непосредственным созданием трансгенных HPPD растений сои с применением ингибитора HPPD, такого как мезотрион, в качестве средства для отбора. Необязательно в полинуклеотиде могут присутствовать другие гены толерантности к гербицидам наряду с другими последовательностями, которые обеспечивают дополнительные средства для отбора/идентификации трансформированных тканей, включая, например, известные гены, которые придают устойчивость к канамицину, гигромицину, фосфинотрицину, бутафенацилу или глифосату. Например, различные бинарные векторы, содержащие селективируемые маркерные гены PAT или EPSPS, вводят посредством трансформации в целевое незрелое семя сои для создания растений, выносливых к пестицидам и гербицидам, с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, и отбора глюфосинатом или глифосатом, как описано (см., например, публикацию патентной заявки США № 20080229447).

Трансформация растения с помощью рекомбинантной *Agrobacterium* обычно включает совместное культивирование *Agrobacterium* с эксплантатами из растения, и ее проводят в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. На селективной среде регенерирует трансформированная ткань, содержащая маркер устойчивости к антибиотикам или гербицидам между граничными последовательностями T-DNA бинарной плазмиды.

Как обсуждалось ранее, другой способ трансформации растений, частей растений и растительных клеток включает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные ткани и клетки. См, например, патенты США №№ 4945050, 5036006 и 5100792. В общем случае этот способ предусматривает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные клетки при условиях, эффективных для проникновения через наружную поверхность клетки и обеспечения встраивания в ее внутреннюю часть. При использовании инертных частиц вектор можно вводить в клетку путем покрытия частиц вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту. В качестве альтернативы клетку или клетку можно окружить вектором таким образом, чтобы вектор переносился в клетку вслед за частицей. Биологически активные частицы (например, высушенная дрожжевая

клетка, высушенная бактерия или бактериофаг, каждая(-ый) из которых содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, подлежащих введению) также можно внедрять в растительную ткань.

5 В других вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению можно напрямую вводить в геном пластид путем трансформации. Технология трансформации пластид подробно описана в патентах США №№ 5451513, 5545817 и 5545818, в заявке согласно РСТ № WO 95/16783 и в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7301-7305.

10 Способы отбора трансформированных трансгенных растений, растительных клеток или культур растительных тканей являются общепринятыми в данной области техники и могут использоваться в способах по настоящему изобретению, предусмотренных в данном документе. Например, рекомбинантный вектор по настоящему изобретению также может включать кассету экспрессии, содержащую нуклеотидную последовательность для селективируемого маркера, который можно  
15 применять для отбора трансформированных растения, части растения или растительной клетки.

Примеры селективируемых маркеров включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую нео или nptII, которые придают устойчивость к канамицину, G418 и т. п. (Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-188);  
20 нуклеотидную последовательность, кодирующую bar, который придает устойчивость к фосфинотрицину; нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную 5-енолпирувиллицимат-3-фосфатсинтазу (EPSP), которая придает устойчивость к глифосату (Hinchee et al. (1988) Biotech. 6:915-922); нуклеотидную последовательность, кодирующую нитрилазу, такую как bxn от *Klebsiella ozaenae*, которая придает  
25 устойчивость к бромоксинулу (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную ацетоллактатсинтазу (ALS), которая придает устойчивость к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (европейская патентная заявка № 154204); нуклеотидную последовательность, кодирующую устойчивую к метотрексату  
30 дигидрофолатредуктазу (DHFR) (Thillet et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:12500-12508); нуклеотидную последовательность, кодирующую далапондегалогеназу, которая придает устойчивость к далапону; нуклеотидную последовательность, кодирующую маннозо-6-фосфатизомеразу (также называемую фосфоманнозоизомеразой (PMI)), которая придает способность к метаболизму маннозы (патенты США № 5767378 и

№ 5994629); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную анранилатсинтазу, которая придает устойчивость к 5-метилтриптофану; или нуклеотидную последовательность, кодирующую hph, который придает устойчивость к гигромицину. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящий селектируемый маркер для применения в касете экспрессии по настоящему изобретению.

Дополнительные селектируемые маркеры включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -глюкуронидазу или uidA (GUS), который кодирует фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты; нуклеотидную последовательность R-локуса, который кодирует продукт, регулирующий продуцирование антоцианиновых пигментов (красного цвета) в растительных тканях (Dellaporta et al., "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac," pp. 263-282, в: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -лактамазу, фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты (например, PADAC, хромогенный цефалоспорин) (Sutcliffe (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-3741); нуклеотидную последовательность, кодирующую xylE, который кодирует катехолдиоксигеназу (Zukowsky et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1101-1105); нуклеотидную последовательность, кодирующую тирозиназу, фермент, способный окислять тирозин до DOPA и допахинона, который, в свою очередь, конденсируется с образованием меланина (Katz et al. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714); нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -галактозидазу, фермент, для которого существуют хромогенные субстраты; нуклеотидную последовательность, кодирующую люциферазу (lux), которая обеспечивает выявление с помощью биолюминесценции (Ow et al. (1986) Science 234:856-859); нуклеотидную последовательность, кодирующую экворин, который может быть использован в обнаружении чувствительной к кальцию биолюминесценции (Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 126:1259-1268); или нуклеотидную последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403-406) или другой флуоресцентный белок, такой как dsRed или mCherry. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящий селектируемый маркер для применения в касете экспрессии по настоящему изобретению.

Дополнительно, как хорошо известно из уровня техники, трансгенные растения целиком можно регенерировать из трансформированных растительных клеток, культур растительных тканей или культивируемых протопластов с применением любой из множества известных методик. Регенерация растений из растительных клеток, культуры растительных тканей или культивируемых протопластов описана, например, в Evans et al. (Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)); и Vasil I. R. (ed.) (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), и Vol. II (1986)).

Кроме того, генетические свойства, обеспеченные с помощью конструирования в трансгенных семенах и растениях, частях растения или растительных клетках по настоящему изобретению, описанных выше, могут передаваться путем полового размножения или вегетативного роста и, следовательно, могут поддерживаться и распространяться в растения-потомки. Обычно при поддержании и распространении применяются известные сельскохозяйственные способы, разработанные для соответствия конкретным целям, таким как уборка урожая, посев или возделывание.

Следовательно, полинуклеотид можно вводить в растение, часть растения или растительную клетку с помощью любого из целого ряда способов, хорошо известных из уровня техники, как описано выше. Следовательно, не придерживаются какого-либо конкретного способа введения одного или нескольких полинуклеотидов в растение, а наоборот, можно применять любой способ, обеспечивающий стабильную интеграцию одного или нескольких полинуклеотидов в геном растения. Если требуется ввести более одного полинуклеотида, то соответствующие полинуклеотиды можно собрать как части одной молекулы нуклеиновой кислоты или как отдельные молекулы нуклеиновых кислот и можно расположить в пределах одной и той же или различных молекул нуклеиновых кислот. Соответственно, введение полинуклеотидов в представляющую интерес клетку можно осуществлять в ходе одного события трансформации, в ходе отдельных событий трансформации или, например, в растениях, как часть протокола скрещивания.

После того как требуемый полинуклеотид введен в конкретный вид растения путем трансформации, при помощи традиционных методик размножения он может передаваться в пределах данного вида или переходить в другие разновидности того же вида, в частности, включающие коммерческие разновидности.

### Инсектицидные композиции

В некоторых вариантах осуществления представлена инсектицидная композиция, содержащая сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению в приемлемом с точки зрения сельского хозяйства носителе.

- 5 Используемое в данном документе выражение "приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель" может включать природный или синтетический, органический или неорганический материал, который объединен с активным белком для облегчения его применения на растении или его части или в растении или его части. Примеры приемлемых с точки зрения сельского хозяйства носителей включают без ограничения порошки, дусты, пеллеты, гранулы, аэрозоли, эмульсии, коллоиды и растворы. Приемлемые с точки зрения сельского хозяйства носители дополнительно включают без ограничения инертные компоненты, диспергирующие вещества, поверхностно-активные вещества, вспомогательные вещества, придающие липкость вещества, клейкие вещества, связующие вещества или их комбинации, которые можно применять в составах, используемых в сельском хозяйстве. Такие композиции можно применять любым способом, посредством которого пестицидные белки или другие средства для контроля вредителей приводят в контакт с вредителями. Соответственно, композиции можно наносить на поверхности растений или частей растений, в том числе на семена, листья, цветки, стебли, клубни, корни и т. п. В других вариантах осуществления растение, продуцирующее инсектицидный сконструированный белок по настоящему изобретению *in planta*, представляет собой приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель экспрессируемого инсектицидного белка, комбинация растения и белка представляет собой инсектицидную композицию.

- В следующих вариантах осуществления инсектицидная композиция содержит бактериальную клетку или трансгенную бактериальную клетку по настоящему изобретению, при этом бактериальная клетка или трансгенная бактериальная клетка продуцирует инсектицидный белок по настоящему изобретению. Такую инсектицидную композицию можно получить путем высушивания, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, осаждения или концентрирования культуры *Bacillus thuringiensis (Bt)*, в том числе культуры трансгенной *Bt*. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере

приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере 99% по весу полипептида по настоящему изобретению. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит от приблизительно 1% до приблизительно 99% по весу инсектицидного белка по настоящему изобретению.

Раскрытые сконструированные белки можно применять в комбинации с другими средствами для контроля вредителей для расширения спектра целевых вредителей и/или для предупреждения или контроля устойчивости насекомых. Кроме того, применение раскрытых инсектицидных белков в комбинации с инсектицидным средством, которое характеризуется другим механизмом действия или целенаправленно воздействует на другой рецептор в пищеварительном канале насекомого, характеризуется особой применимостью в отношении предупреждения устойчивости у насекомых и/или ее контроля.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления представлена композиция, которая контролирует одного или нескольких вредителей растений (например, насекомого-вредителя, такого как насекомое-вредитель, относящееся к чешуекрылым, насекомое-вредитель, относящееся к жесткокрылым, насекомое-вредитель, относящееся к полужесткокрылым, и/или насекомое-вредитель, относящееся к двукрылым), при этом композиция содержит первое средство для контроля вредителей, которое представляет собой раскрытый инсектицидный белок, и по меньшей мере второе средство для контроля вредителей, которое отличается от первого средства для контроля вредителей. В других вариантах осуществления композиция представляет собой состав для местного нанесения на растение. В еще одних вариантах осуществления композиция представляет собой трансгенное растение. В дополнительных вариантах осуществления композиция представляет собой комбинацию, предусматривающую состав и трансгенное растение, на которое он наносится. В некоторых вариантах осуществления состав содержит первое средство для контроля вредителей, которое представляет собой раскрытый инсектицидный белок, если трансгенное растение содержит второе средство для контроля вредителей. В других вариантах осуществления состав содержит второе средство для контроля вредителей, если трансгенное растение содержит первое средство для контроля

вредителей, которое представляет собой сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может представлять собой одно или несколько из химического пестицида, такого как инсектицид, инсектицидный белок *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) и/или отличное от *Bt* пестицидное средство, включая без ограничения инсектицидный белок *Xenorhabdus*, инсектицидный белок *Photorhabdus*, инсектицидный белок *Brevibacillus laterosporus*, инсектицидный белок *Bacillus sphaericus*, ингибитор протеаз (как сериновых, так и цистеиновых типов), лектин, альфа-амилаза, пероксидаза, холестериноксидаза или молекула двухнитевой РНК (dsRNA).

В других вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей представляет собой один или несколько химических пестицидов, которые необязательно представляют собой покрытие для семян. Неограничивающие примеры химических пестицидов включают пиретроиды, карбаматы, неоникотиноиды, блокаторы нейрональных натриевых каналов, инсектицидные макроциклические лактоны, антагонисты гамма-аминомасляной кислоты (GABA), инсектицидные мочевины и имитаторы ювенильных гормонов. В других вариантах осуществления химический пестицид представляет собой одно или несколько из абамектина, ацефата, ацетамиприда, амидофлумета (S-1955), авермектина, азадирахтина, азинфос-метила, бифентрина, бинфеназата, бупрофезина, карбофурана, хлорфенапира, хлорфлуазурина, хлорпирифоса, хлорпирифос-метила, хромафенозида, клотианидина, цифлутрина, бета-цифлутрина, цигалотрина, лямбда-цигалотрина, циперметрина, цирوماзина, дельтаметрина, диафентиурина, диазинона, дифлубензурина, диметоата, диофенолана, эмамектина, эндосульфана, эсфенвалерата, этипрола, фенотикарба, феноксикарба, фенпропатрина, фенпроксимата, фенвалерата, фипронила, флоникамида, флуцитрината, тау-флювалината, флуфенерима (UR-50701), флуфеноксурина, фонофоса, галофенозида, гексафлумурина, имидаклоприда, индоксиакарба, изофенфоса, луфенурина, малатиона, метальдегида, метамидофоса, метидатиона, метомила, метопрена, метоксихлора, монокротофоса, метоксифенозида, нитиазина, новалурина, новифлумурина (XDE-007), оксамила, паратиона, паратион-метила, перметрина, фората, фозалона, фосмета, фосфамидона, пиримикарба, профенофоса, пиметрозина, пиридалила, пирипроксифена, ротенона, спиносада, спиромезифена (BSN 2060), сульпрофоса, тебуфенозида, тефлубензурина, тефлутрина, тербуфоса, тетрахлорвинфоса, тиаклоприда, тиаметоксама, тиодикарба, тиосултап-натрия,

тралометрина, трихлорфона и трифлумурона, алдикарба, оксамила, фенамифоса, амитраза, хинометионата, хлоробензилата, цигексатина, дикофола, диенохлора, этоксазола, феназаквина, оксида фенбутатина, фенпропатрина, фенпироксимата, гекситиазокса, пропаргита, пиридабена и тебуфенпирада. В еще одних вариантах

5 осуществления химический пестицид выбран из одного или нескольких из циперметрина, цигалотрина, цифлутрина и бета-цифлутрина, эсфенвалерата, фенвалерата, тралометрина, фенотикарба, метомила, оксамила, тиодикарба, клотианидина, имидаклоприда, тиаклоприда, индоксикарба, спиносада, абамектина, авермектина, эмамектина, эндосульфана, этипрола, фипронила, флуфеноксурона,

10 трифлумурона, диофенолана, пирипроксифена, пиметрозина и амитраза.

В дополнительных вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может представлять собой один или несколько из множества инсектицидных белков *Bacillus thuringiensis*, в том числе без ограничения белок Cry, вегетативный инсектицидный белок (VIP) и инсектицидные химерные варианты

15 любого из перечисленных выше инсектицидных белков. В других вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей представляет собой белок Cry, выбранный из Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ai, Cry1Aj, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bc, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Bg, Cry1Bh, Cry1Bi, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Dc, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa,

20 Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1Hc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ig, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry1Jd, Cry1Ka, Cry1La, Cry1Ma, Cry1Na, Cry1Nb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah, Cry2Ai, Cry2Aj, Cry2Ak, Cry2Al, Cry2Ba, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Ca, Cry4Cb, Cry4Cc, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ad, Cry5Ba, Cry5Ca, Cry5Da, Cry5Ea, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ac, Cry7Ba, Cry7Bb, Cry7Ca, Cry7Cb, Cry7Da, Cry7Ea, Cry7Fa, Cry7Fb, Cry7Ga, Cry7Gb, Cry7Gc, Cry7Gd, Cry7Ha, Cry7Ia, Cry7Ja, Cry7Ka, Cry7Kb, Cry7La, Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ac, Cry8Ad, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha, Cry8Ia, Cry8Ib, Cry8Ja, Cry8Ka, Cry8Kb, Cry8La, Cry8Ma, Cry8Na, Cry8Pa, Cry8Qa, Cry8Ra, Cry8Sa, Cry8Ta, Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Dc, Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, Cry9Ed, Cry9Ee, Cry9Fa, Cry9Ga, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry14Ab, Cry15Aa, Cry16Aa, Cry17Aa, Cry18Aa, Cry18Ba, Cry18Ca, Cry19Aa, Cry19Ba, Cry19Ca, Cry20Aa, Cry20Ba, Cry21Aa, Cry21Ba, Cry21Ca, Cry21Da, Cry21Ea, Cry21Fa, Cry21Ga, Cry21Ha, Cry22Aa, Cry22Ab, Cry22Ba,

30

Cry22Bb, Cry23Aa, Cry24Aa, Cry24Ba, Cry24Ca, Cry25Aa, Cry26Aa, Cry27Aa, Cry28Aa, Cry29Aa, Cry29Ba, Cry30Aa, Cry30Ba, Cry30Ca, Cry30Da, Cry30Db, Cry30Ea, Cry30Fa, Cry30Ga, Cry31Aa, Cry31Ab, Cry31Ac, Cry31Ad, Cry32Aa, Cry32Ab, Cry32Ba, Cry32Ca, Cry32Cb, Cry32Da, Cry32Ea, Cry32Eb, Cry32Fa, Cry32Ga, Cry32Ha, Cry32Hb, Cry32Ia, Cry32Ja, Cry32Ka, Cry32La, Cry32Ma, Cry32Mb, Cry32Na, Cry32Oa, Cry32Pa, Cry32Qa, Cry32Ra, Cry32Sa, Cry32Ta, Cry32Ua, Cry33Aa, Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac, Cry34Ba, Cry35Aa, Cry35Ab, Cry35Ac, Cry35Ba, Cry36Aa, Cry37Aa, Cry38Aa, Cry39Aa, Cry40Aa, Cry40Ba, Cry40Ca, Cry40Da, Cry41Aa, Cry41Ab, Cry41Ba, Cry42Aa, Cry43Aa, Cry43Ba, Cry43Ca, Cry43Cb, Cry43Cc, Cry44Aa, Cry45Aa, Cry46Aa, Cry46Ab, Cry47Aa, Cry48Aa, Cry48Ab, Cry49Aa, Cry49Ab, Cry50Aa, Cry50Ba, Cry51Aa, Cry52Aa, Cry52Ba, Cry53Aa, Cry53Ab, Cry54Aa, Cry54Ab, Cry54Ba, Cry55Aa, Cry56Aa, Cry57Aa, Cry57Ab, Cry58Aa, Cry59Aa, Cry59Ba, Cry60Aa, Cry60Ba, Cry61Aa, Cry62Aa, Cry63Aa, Cry64Aa, Cry65Aa, Cry66Aa, Cry67Aa, Cry68Aa, Cry69Aa, Cry69Ab, Cry70Aa, Cry70Ba, Cry70Bb, Cry71Aa, Cry72Aa, Cry73Aa или любой комбинации вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей содержит белок Cry1Ab в объекте Bt11 (см. патент США № US6114608), белок Cry3A055 в объекте MIR604 (см. патент США № US8884102), белок eCry3,1Ab в объекте 5307 (см. патент США № US10428393) и/или белок mCry3A в объекте MZI098 (см. патентную заявку США № US20200190533). В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей содержит объект Bt11 (см. патент США № US6114608), объект MIR604 (см. патент США № US8884102), объект 5307 (см. патент США № US10428393) и/или объект MZI098 (см. патентную заявку США № US20200190533).

В следующих вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей представляет собой один или несколько вегетативных инсектицидных белков Vip3. Некоторые структурные признаки, которые идентифицируют белок как принадлежащий классу Vip3 белков, включают 1) размер приблизительно 80-88 кДа, что протеолитически процессируется насекомыми или трипсином до приблизительно 62-66 кДа токсинового ядра (Lee et al. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69:4648-4657); и 2) высококонсервативный N-концевой сигнал секреции, который в естественных условиях не обрабатывается в ходе секреции в *B. thuringiensis*. Неограничивающими примерами представителей класса Vip3 и их соответствующих номеров доступа в GenBank, номера патента США или патентной заявки являются Vip3Aa1 (AAC37036), Vip3Aa2 (AAC37037), Vip3Aa3 (патент США № 6137033), Vip3Aa4 (AAR81079), Vip3Aa5 (AAR81080), Vip3Aa6 (AAR81081), Vip3Aa7 (AAK95326), Vip3Aa8 (AAK97481),

Vip3Aa9 (CAA76665), Vip3Aa10 (AAN60738), Vip3Aa11 (AAR36859), Vip3Aa12 (AAM22456), Vip3Aa13 (AAL69542), Vip3Aa14 (AAQ12340), Vip3Aa15 (AAP51131), Vip3Aa16 (AAW65132), Vip3Aa17 (патент США № 6603063), Vip3Aa18 (AAX49395), Vip3Aa19 (DQ241674), Vip3Aa19 (DQ539887), Vip3Aa20 (DQ539888), Vip3Aa21 (ABD84410), Vip3Aa22 (AAY41427), Vip3Aa23 (AAY41428), Vip3Aa24 (BI 880913), Vip3Aa25 (EF608501), Vip3Aa26 (EU294496), Vip3Aa27 (EU332167), Vip3Aa28 (FJ494817), Vip3Aa29 (FJ626674), Vip3Aa30 (FJ626675), Vip3Aa31 (FJ626676), Vip3Aa32 (FJ626677), Vip3Aa33 (GU073128), Vip3Aa34 (GU073129), Vip3Aa35 (GU733921), Vip3Aa36 (GU951510), Vip3Aa37 (HM132041), Vip3Aa38 (HM117632), Vip3Aa39 (HM117631), Vip3Aa40 (HM132042), Vip3Aa41 (HM132043), Vip3Aa42 (HQ587048), Vip3Aa43 (HQ594534), Vip3Aa44 (HQ650163), Vip3Ab1 (AAR40284), Vip3Ab2 (AAY88247), Vip3Ac1 (публикация патентной заявки США № 20040128716), Vip3Ad1 (публикация патентной заявки США № 20040128716), Vip3Ad2 (CAI43276), Vip3Ae1 (CAI43277), Vip3Af1 (патент США № 7378493), Vip3Af2 (ADN08753), Vip3Af3 (HM117634), Vip3Ag1 (ADN08758), Vip3Ag2 (FJ556803), Vip3Ag3 (HM117633), Vip3Ag4 (HQ414237), Vip3Ag5 (HQ542193), Vip3Ah1 (DQ832323), Vip3Ba1 (AAV70653), Vip3Ba2 (HM117635), Vip3Bb1 (патент США № 7378493), Vip3Bb2 (AB030520) и Vip3Bb3 (ADI48120). В некоторых вариантах осуществления белок Vip3 представляет собой Vip3Aa (патент США № 6137033), например, как представлено объектом MIR162 кукурузы (патент США № 8232456; патент США № 8455720 и патент США № 8618272). В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей содержит объект MIR162 (патент США № 8232456; патент США № 8455720 и патент США № 8618272).

В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может быть получено из источников, отличных от *B. thuringiensis*. Например, второе средство для контроля вредителей может представлять собой альфа-амилазу, пероксидазу, холестериноксидазу, пататин, протеазу, ингибитор протеазы, уреазу, ингибитор альфа-амилазы, порообразующий белок, хитиназу, лектин, сконструированное антитело или фрагмент антитела, инсектицидный белок *Bacillus cereus*, инсектицидный белок *Xenorhabdus* spp. (таких как *X. nematophila* или *X. bovienii*), инсектицидный белок *Photorhabdus* spp. (таких как *P. luminescens* или *P. asymbiotica*), инсектицидный белок *Brevibacillus* spp. (таких как *B. laterosporous*), инсектицидный белок *Lysinibacillus* spp. (таких как *L. sphaericus*), инсектицидный белок *Chromobacterium* spp. (таких как *C. subtsugae* или *C. piscinae*), инсектицидный белок

*Yersinia* spp. (таких как *Y. entomophaga*), инсектицидный белок *Paenibacillus* spp. (таких как *P. propylaea*), инсектицидный белок *Clostridium* spp. (таких как *C. bifementans*), *Pseudomonas* spp. (таких как *P. fluorescens*) и лигнин. В других вариантах осуществления второе средство может представлять собой по меньшей мере один инсектицидный белок, полученный из инсектицидного комплекса токсинов (Тс) из *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia* или *Yersinia*. В других вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой АДФ-рибозилтрансферазу, полученную из инсектицидной бактерии, такой как *Photorhabdus* ssp. В других вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой белок VIP, такой как VIP1 или VIP2 из *B. cereus*. В еще одних вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой бинарный токсин, полученный из инсектицидных бактерий, такой как ISP1A и ISP2A из *B. laterosporous* или BinA и BinB из *L. sphaericus*. В еще одних вариантах осуществления инсектицидный белок может быть сконструированным или может представлять собой гибридный белок или химерную молекулу из любых вышеуказанных инсектицидных белков.

Другие примеры вторых средств для контроля вредителей включают DIG-657 (публикация патентной заявки США 2015366211); PtIP-96 (публикация патентной заявки США 2017233440); PIP-72 (публикация патентной заявки США US2016366891); PIP-83 (публикация патентной заявки США 2016347799); PIP-50 (публикация патентной заявки США 2017166921); IPD73 (публикация патентной заявки США 2019119334); IPD090 (публикация патентной заявки США 2019136258); IPD80 (публикация патентной заявки США 2019256563); IPD078, IPD084, IPD086, IPD087, IPD089 (публикация патентной заявки США 2020055906); IPD093 (публикация международной патентной заявки WO2018111551); IPD059 (публикация международной патентной заявки WO2018232072); IPD113 (публикация международной патентной заявки WO2019178042); IPD121 (публикация международной патентной заявки WO2018208882); IPD110 (публикация международной патентной заявки WO2019178038); IPD103 (публикация международной патентной заявки WO2019125717); IPD092; IPD095; IPD097; IPD099; IPD100, IPD105; IPD106; IPD107; IPD111; IPD112 (публикация международной патентной заявки WO2020055885); IPD102 (публикация международной патентной заявки WO2020076958) Cry1B,868 и Cry1Da\_7 (публикация патентной заявки США 2020-032289); TIC107 (патент США 8049071); Cry2Ab и Cry1A,105 (патент США 10584391); Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 (патент США 10407688); TIC6757, TIC7472,

ТIC7473, TIC6757 (публикация патентной заявки США 2017058294); TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, TIC4260, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862, TIC4863, TIC-3668 (публикация патентной заявки США 2016319302); TIC7040, TIC7042, TIC7381, TIC7382, TIC7383, TIC7386, TIC7388, TIC7389 (публикация патентной заявки США 2018291395); TIC7941 (публикация патентной заявки США 2020229445) TIC836, TIC860, TIC867, TIC868, TIC869, и TIC1100 (публикация международной патентной заявки WO2016061391), TIC2160 (публикация международной патентной заявки WO2016061392), ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, АХМІ-001, АХМІ-002, АХМІ-030, АХМІ-035, и АХМІ-045 (публикация патентной заявки США 20130117884), АХМІ-52, АХМІ-58, АХМІ-88, АХМІ-97, АХМІ-102, АХМІ-112, АХМІ-117, АХМІ-100 (публикация патентной заявки США 201-0310543), АХМІ-115, АХМІ-113, АХМІ-005 (публикация патентной заявки США 20130104259), АХМІ-134 (публикация патентной заявки США 20130167264), АХМІ-150 (публикация патентной заявки США 20100160231), АХМІ-184 (публикация патентной заявки США 20100004176), АХМІ-196, АХМІ-204, АХМІ-207, АХМІ-209 (публикация патентной заявки США 2011-0030096), АХМІ-218, АХМІ-220 (публикация патентной заявки США 20140245491), АХМІ-221z, АХМІ-222z, АХМІ-223z, АХМІ-224z, АХМІ-225z (публикация патентной заявки США 20140196175), АХМІ-238 (публикация патентной заявки США 20140033363), АХМІ-270 (публикация патентной заявки США 20140223598), АХМІ-345 (публикация патентной заявки США 20140373195), АХМІ-335 (публикация международной патентной заявки WO2013134523), DIG-3 (публикация патентной заявки США 20130219570), DIG-5 (публикация патентной заявки США 20100317569), DIG-11 (публикация патентной заявки США 20100319093), AfIP-1A (публикация патентной заявки США 20140033361), AfIP-1B (публикация патентной заявки США 20140033361), PIP-1APIP-1B (публикация патентной заявки США 20140007292), PSEEN3174 (публикация патентной заявки США 20140007292), AECFG-592740 (публикация патентной заявки США 20140007292), Pput\_1063 (публикация патентной заявки США 20140007292), DIG-657 (публикация международной патентной заявки WO2015195594), Pput\_1064 (публикация патентной заявки США 20140007292), GS-135 (публикация патентной заявки США 20120233726), GS153 (публикация патентной заявки США 20120192310), GS154 (публикация патентной заявки США 20120192310), GS155 (публикация патентной заявки США 20120192310), DIG-911 и DIG-180 (публикация патентной заявки США No. 20150264940) и т. п.

В некоторых вариантах осуществления второе пестицидное средство может быть небелковым, например, молекула интерферирующей РНК, такая как dsRNA, которая может экспрессироваться трансгенно или применяться как часть композиции (например, с применением способов местного нанесения). Как правило, интерферирующая РНК содержит по меньшей мере фрагмент РНК, соответствующий целевому гену, спейсерную последовательность и второй фрагмент РНК, который комплементарен первому, за счет чего может образовываться двухнитевая структура РНК. РНК-интерференция (RNAi) происходит, когда организм распознает молекулы двухнитевой РНК (dsRNA) и гидролизует их. Полученные продукты гидролиза представляют собой небольшие фрагменты РНК длиной приблизительно 19–24 нуклеотидов, называемые малыми интерферирующими РНК (siRNA). Затем siRNA распространяются или разносятся по всему организму, в том числе через клеточные мембраны, где они гибридизируются с mRNA (или другими РНК) и вызывают гидролиз РНК. Интерферирующие РНК распознаются комплексом сайленсинга РНК-интерференции (RISC), в который вводится эффекторная цепь (или “направляющая цепь”) РНК. Данная направляющая цепь действует как матрица для распознавания и разрушения дуплексных последовательностей. Этот процесс повторяется каждый раз, когда siRNA гибридизируется с комплементарной ей целевой РНК, эффективно предотвращая трансляцию таких mRNA, и таким образом "сайленсингу" подвергается экспрессия специфических генов, с которых были транскрибированы mRNA. Интерферирующие РНК известны из уровня техники как применяемые для контроля насекомых (см., например, публикацию WO2013/192256, включенную в данный документ посредством ссылки). Интерферирующая РНК, предназначенная для применения в контроле насекомых, обеспечивает получение не встречающейся в естественных условиях двухнитевой РНК, которая пользуется нативными путями RNAi у насекомого для запуска подавления целевых генов, что может приводить к прекращению кормления и/или роста и может приводить к гибели насекомого-вредителя. Молекула интерферирующей РНК может придавать устойчивость к насекомым в отношении того же целевого вредителя, что и раскрытые сконструированные белки, или может целенаправленно воздействовать на другого вредителя. Целевое насекомое-вредитель растения может кормиться путем жевания, сосания или прокалывания. Интерферирующие РНК известны из уровня техники как применимые для контроля насекомых. В некоторых вариантах осуществления dsRNA, применяемая для контроля насекомых, описана в публикациях патентных заявок США

20190185526, 2018020028 или 20190177736. В некоторых вариантах осуществления dsRNA, применимая для контроля насекомых, описана в патентах США №№ 92388223, 9340 797 или 8946510. В некоторых вариантах осуществления dsRNA, применимая для контроля насекомых, описана в публикациях патентных заявок США 20200172922, 20110054007, 20140275208, 20160230185 или 20160230186. В других вариантах осуществления интерферирующая РНК может придавать устойчивость в отношении вредителя растений, отличного от насекомого, такого как нематода-вредитель или вирус-вредитель.

В еще дополнительных вариантах осуществления первое средство для контроля насекомых, которое представляет собой раскрытый сконструированный инсектицидный белок, и второе средство для контроля вредителей коэкспрессируются в трансгенном растении. Такой коэкспрессии более чем одного пестицидного компонента в одном и том же трансгенном растении можно достичь путем получения растения, содержащего и экспрессирующего последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие средства для контроля насекомых, с помощью методов генной инженерии. Например, коэкспрессии более чем одного пестицидного средства в одном и том же трансгенном растении можно достичь путем получения одиночного рекомбинантного вектора, содержащего кодирующие последовательности более чем одного пестицидного средства в так называемом "молекулярном пакете", и генетического конструирования растения, которое бы содержало и экспрессировало все эти пестицидные средства в трансгенном растении. Такие молекулярные пакеты также можно получить с применением минихромосом, которые описаны, например, в патенте США № 7235716. В качестве альтернативы растение, родитель 1, может быть генетически сконструировано для экспрессии раскрытых инсектицидных белков. Второе растение, родитель 2, может быть получено с помощью методов генной инженерии для экспрессии второго средства для контроля вредителей. Путем скрещивания родителя 1 с родителем 2 получают растения-потомки, которые экспрессируют оба средства для контроля насекомых от родителей 1 и 2.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к трансгенному растению с пакетированными признаками, устойчивому к заражению вредителями растений, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующую dsRNA для супрессии основного гена в организме целевого вредителя, и последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующую раскрытый подобный Stg1B или сконструированный инсектицидный

белок, проявляющий инсектицидную активность против целевого вредителя. Ранее сообщалось о том, что dsRNA являются неэффективными против определенных вредителей, относящихся к чешуекрылым (Rajagopal et al. 2002. J. Biol. Chem. 277:468-494), вероятно из-за высокого показателя pH в средней кишке, который нарушает устойчивость dsRNA. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, в которых целевой вредитель является вредителем, относящимся к чешуекрылым, раскрытый инсектицидный белок действует со временным снижением показателя pH в средней кишке, который обеспечивает стабилизацию одновременно поглощаемой dsRNA, делая dsRNA эффективной в сайленсинге целевых генов.

10 Трансгенные растения или семена, содержащие и/или экспрессирующие раскрытый инсектицидный белок, также можно обрабатывать инсектицидом или инсектицидным покрытием для семян, описанным в патентах США №№ 5849320 и 5876739. В некоторых вариантах осуществления, где как инсектицид или инсектицидное покрытие для семян, так и трансгенное растение или семя по  
15 настоящему изобретению являются активными в отношении одного и того же целевого насекомого, например, вредителя, относящегося к чешуекрылым (например, кукурузная листовая совка), данная комбинация применима (i) в способе дополнительного усиления активности композиции по настоящему изобретению против целевого насекомого и/или (ii) в способе предупреждения развития  
20 устойчивости к композиции по настоящему изобретению путем обеспечения еще одного механизма действия против целевого насекомого. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представлен способ повышения контроля популяции насекомых, относящихся к чешуекрылым, включающий обеспечение трансгенного растения или семени по настоящему изобретению и применение по отношению к  
25 растению или семени инсектицида или инсектицидного покрытия для семян, предназначенного для трансгенного растения или семени по настоящему изобретению.

Даже в случае, если инсектицид или инсектицидное покрытие для семян являются активными в отношении другого насекомого, инсектицид или инсектицидное покрытие для семян применимы для расширения диапазона контроля насекомых, например, посредством добавления инсектицида или инсектицидного покрытия для  
30 семян, которые характеризуются активностью в отношении насекомых, относящихся к жесткокрылым, к трансгенному семени по настоящему изобретению, которое в некоторых вариантах осуществления характеризуется активностью в отношении насекомых, относящихся к чешуекрылым, при этом полученное трансгенное семя с

нанесенным покрытием обеспечивает контроль насекомых-вредителей, как относящихся к чешуекрылым, так и относящихся к жесткокрылым.

Способы получения и применения химерных инсектицидных белков, нуклеиновых кислот и трансгенных растений.

5 В дополнение к представленным композициям настоящее изобретение также предусматривает способы получения и применения сконструированного инсектицидного белка по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ получения включает культивирование трансгенной клетки-хозяина, отличной от клетки человека, которая содержит полинуклеотид, кассету  
10 экспрессии или вектор, которая экспрессирует раскрытый сконструированный инсектицидный белок, при условиях, при которых клетка-хозяин продуцирует инсектицидный белок, являющийся токсичным для вредителя, относящегося к чешуекрылым. В некоторых вариантах осуществления трансгенная клетка-хозяин, отличная от клетки человека, представляет собой растительную клетку. В некоторых  
15 других вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку маиса. В некоторых других вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку сои. В других вариантах осуществления условия, при которых выращивают растительную клетку, включают естественный солнечный свет. В других вариантах осуществления трансгенная клетка-хозяин, отличная от клетки человека, представляет собой бактериальную клетку. В еще одних вариантах осуществления трансгенная клетка-хозяин, отличная от клетки человека, представляет собой дрожжевую клетку.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают контроль по меньшей мере одного насекомого-вредителя, относящегося  
25 к чешуекрылым, включая без ограничения одно или несколько из следующего: *Spodoptera* spp., таких как *S. frugiperda* (кукурузная листовая совка), *S. littoralis* (египетская хлопковая совка), *S. ornithogalli* (желто-полосатая совка), *S. praefica* (западная желто-полосатая совка), *S. eridania* (южная совка), *S. litura* (табачная совка/азиатская хлопковая совка), *S. cosmioides* (черная совка), *S. exempta* (африканская совка), *S. mauritia* (луговая совка) и/или *S. exigua* (свекольная совка); *Ostrinia* spp.,  
30 таких как *O. nubilalis* (огневка кукурузная) и/или *O. furnacalis* (азиатский кукурузный мотылек); *Plutella* spp., таких как *P. xylostella* (капустная моль); *Agrotis* spp., таких как *A. ipsilon* (совка-ипсилон), *A. segetum* (совка озимая), *A. gladiaria* (глиняная совка) и/или *A. orthogonia* (совка прямоугольная); *Striacosta* spp., таких как *S. albicosta* (западная

бобовая совка); *Helicoverpa* spp., таких как *H. zea* (совка кукурузная/американская кукурузная совка), *H. punctigera* (австралийская совка) и/или *H. armigera* (совка хлопковая); *Heliothis* spp., таких как *H. virescens* (табачная листовертка); *Diatraea* spp., таких как *D. grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная) и/или *D. saccharalis* (тростниковая огневка); *Trichoplusia* spp., таких как *T. ni* (совка ни); *Sesamia* spp., таких как *S. nonagroides* (мотылек кукурузный средиземноморский), *S. inferens* (розовая стеблевая совка) и/или *S. calamistis* (розовая стеблевая совка); *Pectinophora* spp., таких как *P. gossypiella* (хлопковая моль); *Cochylis* spp., таких как *C. hospes* (полосатая подсолнечная моль); *Manduca* spp., таких как *M. sexta* (табачный бражник) и/или *M. quinquemaculata* (томатный бражник); *Elasmopalpus* spp., таких как *E. lignosellus* (огневка кукурузная стеблевая малая); *Pseudoplusia* spp., таких как *P. includens* (соевая совка); *Anticarsia* spp., таких как *A. gemmatalis* (совка бархатных бобов); *Plathypena* spp., таких как *P. scabra* (совка клеверная); *Pieris* spp., таких как *P. brassicae* (белянка капустная), *Parapipema* spp., таких как *P. nebris* (стеблевой мотылек обыкновенный); *Pseudaletia* spp., таких как *P. unipuncta* (луговая совка); *Peridroma* spp., таких как *P. saucia* (пестрая совка); *Keiferia* spp., таких как *K. lycopersicella* (томатная острица); *Artogeia* spp., таких как *A. rapae* (белянка репная); *Phthorimaea* spp., таких как *P. operculella* (картофельная моль); *Chrysodeixis* spp., таких как *C. includens* (золотистая двупятнистая совка); *Feltia* spp., таких как *F. ducens* (тусклая совка); *Chilo* spp., таких как *C. suppressalis* (огневка желтая рисовая), *C. agamemnon* (восточная кукурузная огневка) и *C. partellus* (крапчатая стеблевая моль), *Snaphalocrocis* spp., таких как *C. medinalis* (огневка рисовая), *Conogethes* spp., таких как *C. punctiferalis* (желтая персиковая моль), *Mythimna* spp., таких как *M. separata* (совка восточная луговая), *Athetis* spp., таких как *A. lepigone* (чайная совка), *Busseola* spp., таких как *B. fusca* (африканский кукурузный стеблевой сверлильщик), *Etiella* spp., таких как *E. zinckenella* (огневка акациевая), *Leguminivora* spp., таких как *L. glycinivorella* (плодожорка соевая), *Matsumuraeses* spp., таких как *M. phaseoli* (плодожорка адзуки), *Omiodes* spp., таких как *O. indicata* (соевый мотылек/паутинная гусеница бобовых листьев), *Rachiplusia* spp., таких как *R. ni* (подсолнечниковая совка), или любой комбинации вышеуказанного. . В некоторых вариантах осуществления способы обеспечивают контроль насекомого-вредителя или колонии кукурузной листовой совки, которая устойчива к белку Vip3A (например, белку Vip3Aa, например, который экспрессируется в объекте MIR162 маиса) и/или Cry1F (например, белку Cry1Fa, например, который экспрессируется в объекте TC1507 маиса).

Также охвачены способы получения трансгенного растения, устойчивого к насекомым (например, устойчивого к насекомым, относящимся к чешуекрылым). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение в растение полинуклеотида, кассеты экспрессии или вектора, содержащих нуклеотидную последовательность, которая кодирует раскрытый сконструированный инсектицидный белок (в том числе токсинные фрагменты и модифицированные формы, которые по сути идентичны полипептидам, конкретно раскрытым в данном документе), при этом нуклеотидная последовательность экспрессируется в растении с получением раскрытого инсектицидного белка, тем самым обеспечивая устойчивость растения к насекомому-вредителю и обеспечивая получение устойчивого к насекомым трансгенного растения (например, по сравнению с подходящим контрольным растением, таким как растение, которое не содержит раскрытые полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и/или не экспрессирует раскрытый инсектицидный полипептид).

В некоторых вариантах осуществления устойчивое к вредителям трансгенное растение является устойчивым у насекомому-вредителю, выбранному из группы, состоящей из *Ostrinia nubilalis* (огневки кукурузной; ECB), *Agrotis ipsilon* (совки-ипсилон; BCW), *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки, FAW), *Diatraea saccharalis* (огневки сахарного тростника; SCB), *Helicoverpa zea* (американской кукурузной совки; CEW), *Chrysodeixis includens* (соевой совки; SBL), *Anticarsia gemmatalis* (совки бархатных бобов; VBC) и *Heliothis virescens* (табачной листовертки; TBW).

В некоторых вариантах осуществления способ введения раскрытых полинуклеотида, кассеты экспрессии или вектора в растение включает сначала трансформацию растительной клетки полинуклеотидом, кассетой экспрессии или вектором и регенерацию из нее трансгенного растения, при этом трансгенное растение содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и экспрессирует раскрытый химерный инсектицидный белок по настоящему изобретению.

В качестве альтернативы или дополнения, стадия введения может включать скрещивание первого растения, содержащего полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор, со вторым растением (например, растением, отличным от первого растения, например, растением, которое не содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор) и необязательно получение растения-потомка, которое содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и экспрессирует раскрытый подобный

Сгу1В или сконструированный инсектицидный белок, с получением тем самым в результате повышенной устойчивости к по меньшей мере одному насекомому-вредителю. Таким образом, трансгенное растение охватывает растение, которое является непосредственным результатом события трансформации, и его потомка (любого поколения), которые содержат полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и необязательно экспрессируют химерный инсектицидный белок, приводящий к повышенной устойчивости к по меньшей мере одному насекомому-вредителю.

В настоящем изобретении, кроме того, представлен способ идентификации трансгенного растения по настоящему изобретению, включающий обнаружение наличия полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора или сконструированного инсектицидного белка по настоящему изобретению в растении (или растительной клетке, части растения и т. п., полученных из него) и идентификацию тем самым растения как трансгенного растения по настоящему изобретению на основании наличия полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора или сконструированного инсектицидного белка по настоящему изобретению.

В вариантах осуществления, кроме того, представлен способ получения трансгенного растения с повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю (например, к по меньшей мере одному вредителю, относящемуся к чешуекрылым), включающий посадку семени, содержащего полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению, и выращивание трансгенного растения из этого семени, где трансгенное растение содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и продуцирует сконструированный инсектицидный белок.

В некоторых вариантах осуществления трансгенные растения, полученные с помощью способов по настоящему изобретению, содержат полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение, полученное способами по настоящему изобретению, включает сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению и необязательно обладает повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю.

Способы получения трансгенного растения, описанные в данном документе, необязательно включают дополнительную стадию сбора семени от трансгенного растения, где семя содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и продуцирует сконструированный инсектицидный белок. Необязательно это семя

обеспечивает получение дополнительного трансгенного растения, которое содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и продуцирует сконструированный инсектицидный белок и, таким образом, обладает повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю.

5            В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены части растения, растительные клетки, органы растения, растительные культуры, семена, растительные экстракты, собранные продукты и переработанные продукты трансгенных растений, полученных с помощью способов по настоящему изобретению.

10            В качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении также представлен способ получения семени, при этом способ включает получение трансгенного растения, которое содержит раскрытые полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор, и сбор семени от трансгенного растения, где семя содержит полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и продуцирует сконструированный инсектицидный белок. Необязательно это семя обеспечивает получение  
15            дополнительного трансгенного растения, которое содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор и продуцирует сконструированный инсектицидный белок и, таким образом, обладает повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю. В иллюстративных вариантах осуществления стадия обеспечения трансгенного растения предусматривает посев семени, из которого  
20            образуется трансгенное растение.

             Кроме того, представлен способ получения гибридного семени растения, при этом способ включает скрещивание первого инбредного растения, которое представляет собой трансгенное растение, содержащее полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению и необязательно экспрессирующее  
25            сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению, с другим инбредным растением (например, инбредным растением, которое не содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению) и обеспечение образования гибридного семени. Необязательно способ дополнительно предусматривает сбор гибридного семени. В вариантах осуществления гибридное семя  
30            содержит полинуклеотид, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению и, в вариантах осуществления, может дополнительно содержать сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению и обладать повышенной устойчивостью к насекомому-вредителю. В некоторых вариантах осуществления гибридное семя дает трансгенное растение, которое содержит полинуклеотид, кассету

экспрессии или вектор по настоящему изобретению, экспрессирует сконструированный инсектицидный белок по настоящему изобретению и обладает повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю.

В следующих вариантах осуществления представлен способ контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым, при этом способ включает доставку в организм вредителей эффективного количества раскрытого инсектицидного сконструированного белка. Для эффективного инсектицидного белка вначале поглощается насекомым пероральным путем. Однако инсектицидный белок можно доставлять в организм насекомого с помощью многих известных способов. Способы доставки белка в организм насекомого пероральным путем предусматривают без ограничения обеспечение белка (1) в трансгенном растении, при этом насекомое съедает (поглощает) одну или несколько частей трансгенного растения, поглощая тем самым полипептид, экспрессируемый в трансгенном растении; (2) в составленной белковой(белковых) композиции(композициях), которые можно наносить, например, на питательную среду насекомых или включать в ее состав; (3) в белковой(белковых) композиции(композициях), которые можно наносить на поверхность, например, путем опрыскивания поверхности части растения, и которая затем заглатывается насекомым в силу того, что насекомое съедает одну или несколько подвергнутых опрыскиванию частей растения; (4) в матрице приманки или (5) с помощью любой другой известной в данной области системы доставки белков. Таким образом, для доставки раскрытых инсектицидных белков по настоящему изобретению можно применять любой способ пероральной доставки в организм насекомого. В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированный белок доставляют в организм насекомого пероральным путем, при этом насекомое поедает одну или несколько частей трансгенного растения.

В других вариантах осуществления раскрываемый инсектицидными белок доставляют в организм насекомого пероральным путем, при этом насекомое поедает одну или несколько частей растения, покрытого или частично покрытого композицией, содержащей инсектицидные белки. Доставку композиций по настоящему изобретению на поверхность растения можно осуществлять с помощью любого способа нанесения соединений, композиций, составов и т. п. на поверхности растений, известного специалистам в данной области техники. Некоторые неограничивающие примеры доставки на растение или его часть или приведения в контакт с ними включают опрыскивание, опыливание, посыпание, распыление, орошение туманом,

мелкодисперсное разбрызгивание, разбрасывание, пропитывание, впрыскивание в почву, введение в почву, смачивание (например, обработку корней, почвы), погружение, полив, нанесение покрытия, впитывание в листья или стебли, внесение в междурядья или обработку семян и т. п. и их комбинации. Эти и другие процедуры приведения растения или его части в контакт с соединением(соединениями), композицией(композициями) или составом(составами) хорошо известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления раскрываемые нуклеотидные и полипептидные последовательности могут быть использованы в биоинформационном анализе для идентификации дополнительных инсектицидных токсинов, как нуклеотидных последовательностей, так и белков, кодируемых нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления такая идентификация дополнительных токсинов может быть основана на проценте идентичности (например, с использованием BLAST или подобного алгоритма). В других вариантах осуществления идентификация дополнительных токсинов может быть выполнена с использованием консервативных белковых доменов или эпитопов (например, Hmmer, psi-BLAST или hhsuite). В некоторых вариантах осуществления биоинформационный анализ включает проведение сравнения идентичности последовательностей и отбор одного или нескольких инсектицидных токсинов-кандидатов, идентичность последовательностей которых превышает определенный порог (например, на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более идентичны) относительно раскрываемой нуклеотидной или полипептидной последовательности по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления биоинформационный анализ включает проведение анализа консервативности домена или эпитопа и отбор одного или более инсектицидных токсинов-кандидатов, которые имеют по меньшей мере один консервативный домен или эпитоп относительно раскрытой нуклеотидной или полипептидной последовательности по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления определение инсектицидной активности раскрытых сконструированных белков можно осуществлять посредством биоанализа на насекомых. Способы биоанализа на насекомых хорошо известны в уровне техники и могут быть “*in vitro*” или “*in planta*”. В биоанализах *in vitro* раскрытые белки доставляют в организм нужного вида насекомого после получения в рекомбинантных

бактериальных штаммах (например, *E. coli*, *Bacillus thuringiensis* Cry-). Осветленные лизаты, содержащие раскрытые сконструированные белки, полученные в этих рекомбинантных бактериальных штаммах, можно скармливать насекомым перорально. В качестве альтернативы, можно получать очищенные сконструированные белки и скармливать их перорально насекомым. В некоторых вариантах осуществления осветленный лизат или очищенный белок наносят на искусственный корм перед заражением насекомыми. В других вариантах осуществления осветленный лизат или очищенный белок подмешивают или включают в искусственный корм перед заражением насекомыми. В биоанализах *in planta* трансгенные растения, экспрессирующие раскрытые белки, используют для доставки токсина в организм нужного вида насекомого. В некоторых вариантах осуществления отобранную ткань скармливают насекомым перорально. Неограничивающие примеры отобранной ткани включают лист, корень, пыльцу, рыльце и стебель. В некоторых вариантах осуществления растительную ткань подмешивают или включают в искусственный корм перед заражением насекомыми. В некоторых вариантах осуществления оцениваемые насекомые находятся на личиночной стадии L1 или являются новорожденными. В других вариантах осуществления оцениваемые насекомые относятся к более поздним личиночным стадиям, а именно личиночным стадиям L2, L3, L4 или L5.

## ПРИМЕРЫ

Варианты осуществления настоящего изобретения можно лучше понять со ссылкой на следующие примеры. Предполагается, что предыдущее и последующее описание вариантов осуществления настоящего изобретения и различные варианты осуществления не ограничивают формулу изобретения, а скорее иллюстрируют ее. Таким образом, будет понятно, что формула изобретения не ограничивается конкретными подробностями данных примеров. Специалистам в данной области будет понятно, что другие варианты осуществления настоящего изобретения могут быть осуществлены на практике без отклонения от сущности и объема данного раскрытия, объем которого определяется прилагаемой формулой изобретения.

**Пример 1. Конструирование химерных подобных Cry1B белков VT-0200Cv1, VT-0200Cv2 и VT-0200Cv3 с улучшенной инсектицидной активностью против кукурузной листовой совки**

Использовали различные подходы конструирования белков в попытке повысить  
 5 активность выделенных подобных Cry1B белков против FAW. С использованием  
 подобного Cry1B белка в качестве матрицы создавали сконструированный белок VT-  
 0200Cv1 с использованием обмена доменов, а именно домена III на домен III из другого  
 белка Cry - Cry1Ca. Мутагенез дополнительных остатков в VT-0200Cv1 привел к  
 10 образованию VT-0200Cv2. Дальнейший мутагенез дополнительных остатков в VT-  
 0200Cv2 привел к образованию VT-0200Cv3. В таблице 1 указаны остатки,  
 подвергшиеся мутагенезу. cDNA, кодирующие оба сконструированных белка, были  
 синтезированы компанией Genscript, Inc. (Пискатауэй, Нью-Джерси) и клонированы в  
 векторы экспрессии для *Bacillus*. Сконструированные кандидаты были  
 экспрессированы в штамме *Bacillus thuringiensis (Bt)*, который не образует кристаллы и  
 15 не обладает видимой фоновой инсектицидной активностью, посредством челночного  
 вектора, обозначенного 23378, сконструированного для экспрессии как в *E. coli*, так и  
*Bt*. Вектор 23378 содержит промотор Cry3, который управляет экспрессией  
 клонированного гена Cry *Bt*, и маркер устойчивости к эритромицину. Кассетами  
 экспрессии, содержащими представляющую интерес последовательность, кодирующую  
 20 Cry, трансформировали клетку-хозяина штамма *Bt* посредством электропорации и  
 проводили отбор трансгенных штаммов *Bt* на чашках с агаром, содержащих  
 эритромицин. Отобранные трансгенные штаммы *Bt* выращивали до фазы споруляции в  
 среде T3 при 28°C в течение 4-5 дней. Клеточные осадки собирали и промывали  
 несколько раз перед солюбилизацией в карбонатном буфере с высоким pH (50 mM),  
 25 содержащем соль и 10 mM DTT. После солюбилизации в буфере с высоким pH раствор  
 белка дополнительно очищали на предварительно уравновешенной эксклюзионной  
 колонке S200. Фракции, содержащие сконструированные белки, объединяли,  
 концентрировали и быстро замораживали в жидком азоте.

Растворимые белки оценивали против одного или нескольких из следующих  
 30 видов насекомых-вредителей с использованием признанного в данной области способа  
 биоанализа с искусственным рационом, подходящего для целевого вредителя: огневки  
 кукурузной (ECB; *Ostrinia nubilalis*), совки-ипсилон (BCW; *Agrotis ipsilon*),  
 американской кукурузной совки (CEW; *Helicoverpa zea*), соевой совки (SBL;  
*Pseudoplusia includens*), совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), табачной

листовертки (TBW; *Heliothis virescens*), западной бобовой совки (WBCW; *Striacosta albicosta*), азиатского кукурузного мотылька (ACB, *Ostrinia furnacalis*) и совки восточной луговой (*Mythimna separata*, OAW). Кроме того, белки тестировали на североамериканском (NA), бразильском (BR) и китайском (CN) биотипах кукурузной

5 листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*). Кроме того, белки тестировали на совке хлопковой (CBW, *Helicoverpa armigera*), чайной совке (TAW, *Athetis lepigone*), огневке желтой рисовой (SSB, *Chilo suppressalis*), розовой стеблевой совке (PSB, *Sesamia inferens*), желтой персиковой моли (YPM, *Conogethes punctiferalis*), биотипе CN совки-ипсилон (CN-BCW) и табачной совке (CCW; *Spodoptera litura*).

10 Равное количество белка в растворе наносили на поверхность искусственного корма для насекомых (Bioserv, Inc., Френчтаун, Нью-Джерси) в 24-луночных планшетах. После высыхания поверхности питательного рациона в каждый планшет добавляли личинок видов насекомых, подлежащих тестированию. Планшеты запечатывали и выдерживали в окружающих условиях лаборатории с учетом

15 температуры, освещения и относительной влажности. Группа положительного контроля состояла из личинок, подвергаемых воздействию очень активного штамма *Bacillus* дикого типа с широким спектром действия. Группы отрицательного контроля состояли из личинок, подвергаемых корму для насекомых, обработанному только буферным раствором, и личинок на необработанном корме для насекомых, т. е. только

20 на корме. Смертность оценивали через приблизительно 120 часов.

Результаты показаны в таблице 2, где “-” означает отсутствие смертности, “+” означает смертность 1-24%, “++” означает смертность 25-49%, “+++” означает смертность 50-74%, а “++++” означает смертность 75-100%. Удивительно, но когда сконструированные белки тестировали в биоанализе на насекомых, они показали

25 сильную инсектицидную активность против североамериканской FAW.

Дополнительную активность наблюдали против огневки кукурузной и двух основных вредителей, относящихся к соевой совке.

Таблица 1. Сконструированные белки посредством обмена доменов и сайт-направленных точечных мутаций

Название	SEQ ID NO	Домен I	Домен II	Домен III	Хвост протоксина	Точечные мутации
BT-0200Cv1	SEQ ID NO: 2	Cry1Be	Cry1Be	Cry1Ca	Cry1Be	Нет

Название	SEQ ID NO :	Домен I	Домен II	Домен III	Хвост протоксина	Точечные мутации
BT-0200Cv2	SEQ ID NO: 1	Cry1Be	Cry1Be	Cry1Ca	Cry1Be	A19T, A232V, V343A, I403T, T443I, S476I, T745I, N746D, E747G, I899T, E1160D, D1161E
BT-0200Cv3	SEQ ID NO: 3	Cry1Be	Cry1Be	Cry1Ca	Cry1Be	Все аминокислотные замены в BT-0200Cv2, а также N674S, K681R, L695M, L712F, T794N, E804Q, A807S, R856K, S852N, P853Q, A884V, V909L, R921K, L922I, R943K, E953D, L957F, D980N, A984V, K996R, R1000K, S1010T, I1031F, A1050S, V1039I, K1151R, A1151T, L1240F

Таблица 2. Спектральный биоанализ сконструированных белков BT-0200C

	NA-FAW	CEW	ECB	BCW	TBW	SBL	VBC	WBCW	ACB
BT-0200Cv1	++++	-	++++	-	++++	++++	++++	NT	++++
BT-0200Cv2	++++	+++	++++	-	NT	++++	++++	+	NT
BT-0200Cv3	NT	-*	NT	-	NT	++++	++++	-	++++
	CN-FAW	CBW	OAW	TAW	SSB	PSB	YPM	CN-BCW	CCW
BT-0200Cv1	NT	-	++++	++++	++++	++++	NT	NT	NT
BT-0200Cv2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BT-0200Cv3	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++

NT = не тестировали; \* = задержка роста выживших личинок.

- 5 Чтобы определить, обусловлена ли токсичность сконструированных белков BT-0200C по отношению к FAW посредством механизма действия (МОА), отличного от Cry1Fa и Vip3A, белки оценивали на эффективность против штаммов FAW, устойчивых к отдельным токсинам. Проводили анализ с нанесением на корм однократной дозы очищенного белка, 2 мкг/см<sup>2</sup>. В таблице 3 представлены результаты

биоанализа устойчивых колоний, в котором использовали та же система оценки, что и в таблице 2. Все три сконструированных токсина демонстрировали высокую степень эффективности против BR-FAW, устойчивого к Cry1F. Кроме того, как BT-0200Cv1, так и BT-0200Cv2 демонстрировали высокую степень эффективности против FAW, устойчивого к Vip3A. Эти данные позволяют предположить, что их механизм действия отличается от механизма действия белков Cry1F и Vip3A.

Таблица 3. Инсектицидная активность сконструированных BT-0200Cv1 и BT-0200Cv2 против устойчивых колоний кукурузной листовой совки

Устойчивая колония	BT-0200Cv1	BT-0200Cv2	BT-0200Cv3
BR-FAW (Cry1F <sup>R</sup> )	++++	++++	++++
PR-FAW (Cry1F <sup>R</sup> )	++++*	NT	NT
Vip3A <sup>R</sup> -FAW	+**	++++	NT

NT = не тестировали; PR = Биотип Puerto Rico FAW; \*тестировали лизат цельных клеток; \*\*тестировали лизат цельных клеток, при завершении биоанализа наблюдали задержку роста личинок.

### Пример 2. Введение генов в вектор для экспрессии в растении

Синтетические полинуклеотиды, содержащие кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие BT-0200Cv2 (SEQ ID NO: 4 и 5) синтезировали на платформе автоматического генного синтеза (Genscript, Inc. Пискатауэй, Нью-Джерси). Создавали кассеты экспрессии, содержащие экспрессируемый в растениях промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок BT-0200Cv2, которая функционально связана с последовательностью терминатора. Создавали две дополнительные кассеты экспрессии, содержащие экспрессируемый в растениях промотор, функционально связанный с селективируемым маркером, который функционально связан с терминатором. Экспрессия селективируемого маркера позволяет идентифицировать трансгенные растения на селекционных средах, а также в полевых испытаниях. Все кассеты экспрессии клонировали в подходящий вектор для трансформации сои или маиса, опосредованной *Agrobacterium*.

### Пример 3. Трансформация маиса

Трансформацию незрелых зародышей маиса выполняли, главным образом, как описано в Negrotto et al. (*Plant Cell Reports* (2000)19: 798-803). Вкратце, штамм *Agrobacterium* LBA4404 (pSB1), содержащий вектор экспрессии, описанный в примере 2, выращивали на твердой среде YEP (дрожжевой экстракт (5 г/л), пептон (10 г/л), NaCl (5 г/л), 15 г/л агара, pH 6,8), в течение 2-4 дней при 28°C. Приблизительно  $0,8 \times 10^9$  клеток *Agrobacterium* суспендировали в среде LS-inf, дополненной 100 мкМ As. Бактерий предварительно индуцировали в данной среде в течение примерно 30-60 минут.

Незрелые зародыши инбредной линии маиса вырезали из початков возрастом 8-12 дней с переносом в жидкую среду LS-inf + 100 мкМ As. Зародыши однократно ополаскивали свежей средой для инфицирования. Затем добавляли раствор *Agrobacterium*, зародыши перемешивали на вихревой мешалке в течение 30 секунд и оставляли осесть с бактериями в течение 5 минут. Затем зародыши переносили стороной со щитком зародыша кверху на среду LSAs и культивировали в темноте в течение двух-трех дней. Затем от приблизительно 20 до 25 зародышей на чашку Петри переносили на среду LSDc, дополненную цефотаксимом (250 мг/л) и нитратом серебра (1,6 мг/л), и культивировали в темноте при приблизительно 28°C в течение 10 дней.

Незрелые зародыши, образующие эмбриогенный каллюс, переносили в среду LSD1M0.5S. Селекцию культур на этой среде осуществляли в течение примерно 6 недель, при этом через приблизительно 3 недели проводили стадию субкультивирования. Выжившие каллюсы переносили на среду Reg1, дополненную маннозой. После культивирования на свету (в режиме 16 часов света/8 часов темноты) зеленые ткани затем переносили на среду Reg2 без регуляторов роста и инкубировали в течение приблизительно 1-2 недель. Проростки переносили в контейнеры Magenta GA-7 (Magenta Corp, Чикаго, Иллинойс), содержащие среду Reg3, и выращивали на свету. Через приблизительно 2-3 недели растения тестировали с помощью ПЦР в отношении присутствия селективного маркерного гена и раскрываемого химерного гена. Растения, показавшие положительные результаты в ПЦР-анализе, переносили в теплицу для дальнейшей оценки.

#### Пример 4. Экспрессия и активность сконструированного BT-0200Cv2 в растениях маиса

Создавали трансгенные растения маиса по сути, как описано в примере 3.

Трансгенные растения маиса оценивали в отношении числа копий (определяли с помощью анализа TaqMan), уровня экспрессии белка (определяли с помощью ELISA) и эффективности против представляющих интерес видов насекомых в биоанализах с вырезанием листа. В частности, ткань листа растения вырезали из однокопийных объектов (на стадии V3-V4) и заражали новорожденными личинками и личинками на 3<sup>ей</sup> стадии целевого вредителя, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 дней. Листовые диски трансгенных растений, экспрессирующих BT-0200Cv2, тестировали против трех различных колоний кукурузной листовой совки.

Результаты подтверждают, что трансгенные растения экспрессируют BT-0200Cv2 и активны против насекомых-вредителей. Экспрессия белка в трансгенных объектах для сконструированного BT-0200Cv2 находилась в диапазоне от приблизительно 115 до 150 нг/мг TSP. Трансгенные объекты обеспечивали защиту от личинок FAW, при этом в большинстве образцов обнаруживали менее 5% повреждений листовых дисков. В таблице 4 представлены данные T0 для BT-0200Cv2, где “-” указывает на повреждение > 50% листовых дисков, “+/-” указывает на повреждение 20-50% листовых дисков, “+” указывает на повреждение 6-20% листовых дисков, “+++” указывает на повреждение 1-5% листовых дисков, а “+++” указывает на повреждение менее 1% листовых дисков.

Таблица 4. Экспрессия BT-0200Cv2 T0 маиса и биоанализ на насекомых

Конструкция	ELISA T0 (нг/мг TSP)			Новорожденные личинки			Личинки 3 <sup>ей</sup> стадии	
	Среднее	Диапазон	N	BR FAW	Vip3A <sup>R</sup> FAW	NA FAW	BR FAW	Vip3A <sup>R</sup> FAW
1	125	0-322	35	+++	+++	+++	++	+++
2	149	0-268	23	+++	++	++	++	++
3	115	0-235	34	+++	+++	+++	++	+++

Создавали дополнительные растения маиса T0, как описано в примере 3, которые трансформировали конструкциями, экспрессирующими либо BT-0200Cv2, либо BT-0200Cv3, управляемые различными комбинациями промотор-энхансер. Трансгенные растения маиса оценивали в отношении числа копий (определяли с помощью анализа TaqMan), уровня экспрессии белка (определяли с помощью ELISA) и эффективности против представляющих интерес видов насекомых в биоанализах с

вырезанием листа. В частности, ткань листа растения вырезали из однокопийных объектов (на стадии V3-V4) и заражали новорожденными личинками и личинками на 3<sup>ей</sup> стадии целевого вредителя, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 дней. Листовые диски из трансгенных растений, экспрессирующих ВТ-0200Cv2 и ВТ-0200Cv3, тестировали против бразильского биотипа кукурузной листовой совки.

Результаты подтверждают, что трансгенные растения экспрессируют ВТ-0200Cv2 или ВТ-0200Cv3 и активны против насекомых-вредителей. Экспрессия белка в трансгенных объектах для сконструированных белков находилась в диапазоне от приблизительно 86 до 203 нг/мг TSP. Трансгенные объекты обеспечивали защиту от новорожденных FAW, при этом в большинстве образцов обнаруживали менее 5% повреждений листовых дисков. Подобным образом, трансгенные объекты обеспечивали защиту от личинок FAW 3<sup>ей</sup> стадии, при этом в большинстве образцов обнаруживали менее 5% повреждений листовых дисков. В таблице 5 представлены данные T0 для трансгенных объектов, где “-” указывает на повреждение > 50% листовых дисков, “+/-” указывает на повреждение 20-50% листовых дисков, “+” указывает на повреждение 6-20% листовых дисков, “++” указывает на повреждение 1-5% листовых дисков, а “+++” указывает на повреждение менее 1% листовых дисков.

Таблица 5. Экспрессия ВТ-0200Cv2 и ВТ-0200Cv3 T0 маиса и биоанализ на насекомых

Конструкция	Белок	ELISA T0 (нг/мг TSP)				Новорожденные личинки BR FAW	Личинки 3 <sup>ей</sup> стадии BR FAW
		Среднее	Медиана	Диапазон	N		
1	ВТ-0200Cv2	102	107	0-184	28	++	++
2	ВТ-0200Cv3	120	113	80-192	26	+++	++
3	ВТ-0200Cv2	139	129	0-270	35	+++	++
4	ВТ-0200Cv3	93	86	33-140	14	+++	++
5	ВТ-0200Cv2	204	203	91-320	20	+++	++
6	ВТ-0200Cv3	113	115	66-177	21	+++	++

### Пример 5. Трансформация сои

Бинарные векторы для трансформации двудольных растений (сое) конструировали с использованием подходящего для сои промотора, управляющего экспрессией сконструированных белков (SEQ ID NO: 1, 2 или 3). Полинуклеотидные последовательности сконструированных генов могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в сое на основе предсказанной аминокислотной последовательности их

кодирующих областей. Бинарные векторы трансформации *Agrobacterium*, содержащие кассету экспрессии, содержащую кодирующую последовательность химерного инсектицидного белка, конструировали путем добавления также селективируемого маркерного гена трансформации. Кодирующие последовательности селективируемых маркеров также могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в сое.

Растения сои T0 переносили из тканевой культуры в теплицу, где их высаживали в насыщенную водой почву (Redi-Earth.RTM. Plug и Seedling Mix, Sun Gro Horticulture, Белвью, Вашингтон), смешанную с 1% гранулированного Marathon.RTM. (Olympic Horticultural Products, Co., Мейнленд, Пенсильвания) при 5-10 г/галлон Redi-Earth.RTM. Смешивали в квадратных горшках диаметром 2 дюйма. Растения покрывали колпаком для сохранения влаги и помещали в камеру Conviron (Пембина, Северная Дакота) при следующих окружающих условиях: 24°C днем; 18°C ночью; 16-часовой световой период - 8-часовой темный период; и 80% относительная влажность.

После того, как растения укоренились в почве и появился подрост (приблизительно 1-2 недели), отбирали образцы растений и тестировали на наличие требуемого трансгена с помощью анализа Taqman™ с использованием соответствующих зондов для генов или промоторов (например, prCMP и prUBq3). Все положительные и несколько отрицательных растений пересаживали в квадратные горшки диаметром 4 дюйма с почвой MetroMix™ 380 (Sun Gro Horticulture, Белвью, Вашингтон). Удобрение с медленным высвобождением Sierra 17-6-12 вводили в почву при рекомендованной норме внесения. Контролем служат отрицательные растения. Затем растения перемещали в стандартную теплицу для акклиматизации (приблизительно 1 неделя). Окружающие условия обычно были следующими: 27°C днем; 21°C ночью; 16-часовой световой период (с естественным освещением); влажность окружающей среды. После акклиматизации (приблизительно 1 недели) растения были готовы к тестированию. Инсектицидные трансгенные растения сои выращивали до зрелости с получением семян. Трансгенные семена и потомство растений использовали для дальнейшей оценки их производительности и молекулярных характеристик.

### **Пример 6. Экспрессия и активность сконструированного BT-0200Cv2 в растениях маиса**

Создавали трансгенные растения сои по сути, как описано в примере 5. Трансгенные растения сои оценивали в отношении числа копий (определяли с

помощью анализа TaqMan), уровня экспрессии белка (определяли с помощью ELISA) и эффективности против представляющих интерес видов насекомых в биоанализах с вырезанием листа. В частности, ткань листа растения вырезали из однокопийных объектов и заражали новорожденными личинками целевого вредителя, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 дней. Листовые диски трансгенных растений, экспрессирующих BT-0200Cv2 или BT-0200Cv3, тестировали против трех разных насекомых-вредителей, а именно соевой совки (SBL), совки бархатных бобов (VBC) и бразильского биотипа кукурузной листовой совки (BR FAW).

Результаты подтверждают, что трансгенные растения экспрессируют BT-0200Cv2 или BT-0200Cv3 и активны против насекомых-вредителей. Экспрессия белка в трансгенных объектах для сконструированных белков находилась в диапазоне от приблизительно 120 до 200 нг/мг TSP. Трансгенные объекты обеспечивали защиту от новорожденных личинок, при этом в большинстве образцов обнаруживали менее 5% повреждений листовых дисков. В таблице 6 представлены данные T0 для сконструированных белков, где “-” указывает на повреждение > 50% листовых дисков, “+/-” указывает на повреждение 20-50% листовых дисков, “+” указывает на повреждение 6-20% листовых дисков, “++” указывает на повреждение 1-5% листовых дисков, а “+++” указывает на повреждение менее 1% листовых дисков.

Таблица 6. Экспрессия BT-0200Cv2 и BT-0200Cv3 T0 сои и биоанализ на насекомых

Конструкция	Белок	ELISA T0 (нг/мг TSP)				Соевая совка (SBL)	Совка бархатных бобов (VBC)	BR FAW
		Среднее	Медиана	Диапазон	N			
1	BT-0200Cv2	150	123	31-650	28	+++	+++	+++
2	BT-0200Cv3	120	120	77-177	29	+++	+++	+++
3	BT-0200Cv2	158	130	13-410	12	+++	+++	+++
4	BT-0200Cv3	200	202	86-308	26	+++	+++	+++

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 96% идентична SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит SEQ ID NO:1.
3. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит SEQ ID NO:2.
4. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит SEQ ID NO:3.
5. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит домен I, происходящий из белка CgylB, домен II, происходящий из белка CgylB, и домен III, происходящий из белка  
10 CgylC.
6. Полипептид по п. 5, где полипептид содержит С-концевой хвост из белка CgylB.
7. Полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.
8. Нуклеиновая кислота, содержащая кодирующую последовательность, которая  
15 кодирует полипептид по любому из пп. 1-7.
9. Нуклеиновая кислота по п. 8, где кодирующая последовательность содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO:4-9 или содержит любую из них.
10. Нуклеиновая кислота по п. 8 или п. 9, где кодирующая последовательность является  
20 кодон-оптимизированной для экспрессии в растении.
11. Нуклеиновая кислота по п. 10, где кодирующая последовательность функционально связана с гетерологичным промотором.
12. Нуклеиновая кислота по п. 11, где гетерологичный промотор представляет собой неактивный в пыльце промотор.
- 25 13. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 8-12.
14. Трансгенная клетка-хозяин, содержащая полипептид по любому из пп. 1-7 или нуклеиновую кислоту по любому из пп. 8-12.
15. Трансгенная клетка-хозяин по п. 14, где трансгенная клетка-хозяин представляет собой растительную клетку.
- 30 16. Трансгенная клетка-хозяин по п. 15, где растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения.
17. Трансгенная клетка-хозяин по п. 16, где растительная клетка представляет собой клетку маиса.

18. Трансгенная клетка-хозяин по п. 15, где растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения.
19. Трансгенная клетка-хозяин по п. 18, где растительная клетка представляет собой клетку сои.
- 5 20. Трансгенная клетка-хозяин по п. 14, где трансгенная клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку.
21. Трансгенная клетка-хозяин по п. 20, где бактериальная клетка представляет собой клетку *Agrobacterium*, *Bacillus* или *Escherichia coli*.
22. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-7.
- 10 23. Композиция по п. 22, дополнительно содержащая приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.
24. Растение, содержащее полипептид по любому из пп. 1-6 или нуклеиновую кислоту по любому из пп. 8-12.
25. Растение по п. 24, где растение является однодольным.
- 15 26. Растение по п. 25, где растение представляет собой растение маиса.
27. Растение по п. 24, где растение является двудольным.
28. Растение по п. 27, где растение представляет собой растение сои.
29. Семя растения по любому из пп. 24-28.
30. Товарный продукт, полученный из растения по любому из пп. 24-28, при этом необязательно товарный продукт представляет собой зерно, крахмал, масло из семян, патоку, муку тонкого помола, муку грубого помола, крахмал, крупу или белок.
- 20 31. Способ получения трансгенного растения, где способ включает
- 25     а) введение в растительную клетку нуклеиновой кислоты по любому из пп. 8-12;
- б) отбор растительной клетки, содержащей нуклеиновую кислоту; и
- с) регенерацию растения из отобранной растительной клетки.
32. Способ получения трансгенного растения, где способ включает скрещивание первого растения, содержащего нуклеиновую кислоту по любому из пп. 8-12, со
- 30 вторым растением с получением тем самым трансгенного растения.
33. Способ контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым, включающий доставку в организм вредителя полипептида по любому из пп. 1-7.
34. Способ по п. 33, где полипептид доставляют путем скармливания.

35. Способ по п. 34, где скармливание включает питание вредителя на части растения, которая содержит полипептид.
36. Применение последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-9 в биоинформационном анализе для идентификации инсектицидного белка.
- 5 37. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в биоанализе на насекомых для идентификации инсектицидного белка.