

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490504 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.15

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)  
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.01.13

---

(54) РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) 62/969,993

(32) 2020.02.04

(33) US

(62) 202292014; 2021.01.13

(71) Заявитель:  
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК  
(US)

(72) Изобретатель:

Армстронг Чарльз Л., Куранов  
Андрей Ю., О'Брайен Брент А. (US)

(74) Представитель:

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)

---

(57) Изобретение относится к молекулам и конструкциям рекомбинантной ДНК, а также к их нуклеотидным последовательностям, пригодным для модулирования экспрессии генов в растениях. Изобретение также относится к трансгенным растениям, клеткам растений, частям растений и семенам, содержащим молекулы рекомбинантной ДНК, функционально связанные с гетерологичными транскрибируемыми молекулами ДНК, а также к способам их применения.

---

A1

202490504

202490504

A1

## РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

### 5 ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[01] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/969993, поданной 4 февраля 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

### ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 [02] Перечень последовательностей, содержащийся в файле, названном «MONS479WO\_ST25.txt», составляет 41,2 килобайт (согласно измерениям Microsoft Windows®), был создан 11 января 2021 г., подан в электронном виде и включен в данный документ посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

15 [03] Изобретение относится к области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений. Более конкретно, изобретение относится к молекулам ДНК, пригодным для модулирования экспрессии генов в растениях.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 [04] Регуляторные элементы представляют собой генетические элементы, которые регулируют активность генов путем модулирования транскрипции функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Такие элементы могут включать промоторы, лидеры, интроны и 3'-нетранслируемые области и могут использоваться в области молекулярной биологии растений и генетической инженерии растений.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 [05] Данное изобретение относится к элементам регуляции генов для применения в растениях. Данное изобретение также относится к конструкциям молекул рекомбинантной ДНК, содержащим регуляторные элементы. Данное изобретение также относится к клеткам трансгенного растения, растениям и семенам, содержащим регуляторные элементы. В одном варианте осуществления регуляторные элементы  
30 функционально связаны с транскрибируемой молекулой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, молекула транскрибируемой ДНК может быть гетерологичной по отношению к регуляторной последовательности. Таким образом, последовательность регуляторного элемента, предложенная изобретением, в конкретных вариантах осуществления может быть определена как функционально

связанная с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Данное изобретение также относится к способам применения регуляторных элементов и получения и применения молекулы рекомбинантной ДНК, содержащих регуляторные элементы, и трансгенных клеток растений, растений и семян, содержащих регуляторные элементы, функционально связанные с молекулой транскрибируемой ДНК.

[06] Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности, по меньшей мере на около 85 процентов идентичной любой последовательности из SEQ ID NO: 1-20; (b) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-20; и (с) фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-20, при этом этот фрагмент обладает ген-регуляторной активностью; при этом последовательность функционально связана с гетерологичной молекулой транскрибируемой ДНК. Под «гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК» подразумевается, что транскрибируемая молекула ДНК является гетерологичной по отношению к полинуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. В конкретных вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК содержит последовательность ДНК, имеющую идентичность последовательности на по меньшей мере около 85 процентов, по меньшей мере около 86 процентов, по меньшей мере около 87 процентов, по меньшей мере около 88 процентов, по меньшей мере около 89 процентов, по меньшей мере около 90 процентов, по меньшей мере 91 процент, по меньшей мере 92 процента, по меньшей мере 93 процента, по меньшей мере 94 процента, по меньшей мере 95 процентов, по меньшей мере 96 процентов, по меньшей мере 97 процентов, по меньшей мере 98 процентов или по меньшей мере 99 процентов последовательности ДНК любой из SEQ ID NO:1-20.

[07] В другом аспекте в данном документе предложены трансгенные клетки растений, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности, по меньшей мере на около 85 процентов идентичной любой последовательности из SEQ ID NO: 1-20; (b) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-20; и (с) фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-20, при этом этот фрагмент обладает ген-регуляторной активностью; при этом последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной молекулой транскрибируемой ДНК. В определенных вариантах осуществления клетка трансгенного растения представляет

собой клетку однодольного растения. В других вариантах осуществления клетка трансгенного растения представляет собой клетку двудольного растения.

[08] В еще одном аспекте в данном документе дополнительно представлено трансгенное растение или его часть, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: а) последовательности, по меньшей мере на около 85 процентов идентичной любой последовательности из SEQ ID NO: 1-20; б) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-20; и с) фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-20, при этом этот фрагмент обладает ген-регуляторной активностью; при этом последовательность функционально связана с гетерологичной молекулой транскрибируемой ДНК. В конкретных вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой потомство растения любого поколения, которое содержит молекулу рекомбинантной ДНК. В данном документе также предусмотрено трансгенное семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, которое обеспечивает такое трансгенное растение при выращивании.

[09] В другом аспекте изобретение относится к способу получения товарного продукта, включающему получение трансгенного растения или его части, содержащих молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению, и получение из него товарного продукта. В одном варианте осуществления товарный продукт представляет собой семена, обработанные семена, белковый концентрат, белковый изолят, крахмал, зерна, части растений, масло из семян, биомассу, муку мелкого помола и муку грубого помола.

[10] В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения трансгенного растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению, включающему трансформацию клетки растения с помощью молекулы рекомбинантной ДНК по изобретению для получения трансформированной клетки растения и регенерацию трансгенного растения из трансформированной клетки растения.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[11] SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.GRMZM2G487322:2, полученную из *Zea mays*.

[12] SEQ ID NO:2 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.GRMZM2G487322:2, полученную из *Zea mays*.

- [13] SEQ ID NO:3 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.GRMZM2G339781:1, полученную из *Zea mays*.
- [14] SEQ ID NO:4 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.GRMZM2G339781:1, полученную из *Zea mays*.
- [15] SEQ ID NO:5 представляет собой последовательность ДНК группы элементов регуляторной экспрессии или EXP, EXP-Zm.Xet:1, содержащую промотор, функционально связанный с лидером (P-Zm.Xet:1), функционально связанным с интроном (I-Zm.Xet:1), полученную из *Zea mays*.
- [16] SEQ ID NO:6 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.Xet:1, полученную из *Zea mays*.
- [17] SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность ДНК интрона, I-Zm.Xet:1, полученную из *Zea mays*.
- [18] SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.Xet:1, полученную из *Zea mays*.
- [19] SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-Zm.Sat6:1, содержащую промотор, функционально связанный с лидером (P-Zm.Sat6:1), функционально связанным с интроном (I-Zm.Sat6:1), полученную из *Zea mays*.
- [20] SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.Sat6:1, полученную из *Zea mays*.
- [21] SEQ ID NO:11 представляет собой последовательность ДНК интрона, I-Zm.Sat6:1, полученную из *Zea mays*.
- [22] SEQ ID NO:12 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.Sat6:1, полученную из *Zea mays*.
- [23] SEQ ID NO:13 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-Zm.GRMZM2G049726:1, содержащую промотор, функционально связанный с лидером (P-Zm.GRMZM2G049726:1), функционально связанным с интроном (I-Zm.GRMZM2G049726:1), полученную из *Zea mays*.
- [24] SEQ ID NO:14 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.GRMZM2G049726:1, полученную из *Zea mays*.
- [25] SEQ ID NO:15 представляет собой последовательность ДНК интрона, I-Zm.GRMZM2G049726:1, полученную из *Zea mays*.

[26] SEQ ID NO:16 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.GRMZM2G049726:1, полученную из *Zea mays*.

[27] SEQ ID NO:17 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.GRMZM2G141762:1, полученную из *Zea mays*.

[28] SEQ ID NO:18 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.DSUL:1, полученную из *Zea mays*.

[29] SEQ ID NO:19 представляет собой последовательность ДНК промотора, функционально связанную с лидером, P-Zm.GRMZM2G512113:1, полученную из *Zea mays*.

[30] SEQ ID NO:20 представляет собой последовательность ДНК 3' НТО, T-Zm.GRMZM2G512113:1, полученную из *Zea mays*.

[31] SEQ ID NO:21 представляет собой синтезированную кодирующую последовательность, оптимизированную для экспрессии в растении β-глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1), с процессируемым интроном, полученным из тканеспецифичного индуцируемого светом гена St-LS1 картофеля (доступ Genbank: X04753).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[32] Изобретение предлагает регуляторные элементы, обладающие ген-регуляторной активностью в растениях. Нуклеотидные последовательности этих регуляторных элементов представлены как SEQ ID NO:1-20. Эти регуляторные элементы способны влиять на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК в тканях растений и, следовательно, регулировать экспрессию гена функционально связанного трансгена в трансгенных растениях. Изобретение также предлагает способы модификации, получения и применения рекомбинантных молекул ДНК, содержащих предложенные регуляторные элементы. Изобретение также предлагает композиции, которые включают трансгенные растительные клетки, растения, части растений и семена, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК по изобретению, и способы их получения и применения.

[33] Следующие определения и способы предназначены для лучшего определения настоящего изобретения и руководства для специалистов в данной области техники при практическом применении настоящего изобретения. Если не указано иное, термины

следует понимать в соответствии с общепринятым использованием специалистами в соответствующей области техники.

### **Молекулы ДНК**

[34] Как используется в данном документе, термин «ДНК» или «молекула ДНК»  
5 относится к двухцепочечной молекуле ДНК геномного или синтетического происхождения, *т. е.* полимеру дезоксирибонуклеотидных оснований или молекуле ДНК, считываемой с 5'-конца (выше) до 3'-конца (ниже). Как используется в данном документе, термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной  
10 последовательности молекулы ДНК. Используемая в данном документе терминология соответствует терминологии раздела 37 Свода федеральных правил США, § 1.822 и изложена в таблицах стандарта ВОИС ST.25 (1998 г.), приложение 2, таблицы 1 и 3.

[35] Используемый в данном документе термин «рекомбинантная молекула ДНК»  
представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые  
15 не могли бы встречаться вместе в природе без вмешательства человека. Например, рекомбинантная молекула ДНК может представлять собой молекулу ДНК, которая состоит по меньшей мере из двух молекул ДНК, гетерологичных по отношению друг к другу, молекулу ДНК, которая содержит последовательность ДНК, которая отличается от последовательностей ДНК, существующих в природе, молекулу ДНК, которая  
20 включает синтезированную последовательность ДНК, или молекулу ДНК, которая была включена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генов.

[36] Ссылка в этой заявке на «выделенную молекулу ДНК» или эквивалентный  
термин или фразу предназначена для обозначения того, что молекула ДНК  
представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в комбинации с  
25 другими композициями, но не в своем природном окружении. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и т.п., которые природным образом присутствуют в ДНК генома организма, не считаются  
30 «выделенными» при условии, что элемент находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природных условиях. Однако каждый из этих элементов и подчасти этих элементов будут «выделены» в рамках настоящего раскрытия, если элемент не находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природных условиях. Подобным образом, нуклеотидная

последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет выделенной нуклеотидной последовательностью, если эта нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, из которой в природе обнаружена последовательность, кодирующая белок.

5 Синтезированная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность встречающегося в природе инсектицидного белка, будет считаться выделенной для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего раскрытия любая трансгенная нуклеотидная последовательность, т. е. нуклеотидная последовательность ДНК, встроенная в геном клеток растения или бактерии или  
10 присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она в плазмиде или аналогичной структуре, используемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии или присутствует в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из  
15 растения или бактерии.

[37] Как используется в данном документе, термин «идентичность последовательностей» относится к степени идентичности двух оптимально выровненных полинуклеотидных последовательностей или двух оптимально выровненных полипептидных последовательностей. Оптимальное выравнивание  
20 последовательностей создается путем ручного выравнивания двух последовательностей, например, эталонной последовательности и другой последовательности, чтобы максимально увеличить количество совпадений нуклеотидов в выравнивании последовательностей с соответствующими внутренними нуклеотидными вставками, делециями или гэпами. Как используется в данном  
25 документе, термин «эталонная последовательность» относится к последовательности ДНК, представленной под SEQ ID NO: 1-20.

[38] Как используется в данном документе, термин «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности» или «% идентичности» представляет собой долю идентичности, умноженную на 100. «Доля идентичности» для  
30 последовательности, оптимально выровненной с эталонной последовательностью, представляет собой количество совпадений нуклеотидов в оптимальном выравнивании, разделенное на общее количество нуклеотидов в эталонной последовательности, например, общее количество нуклеотидов в полной длине всей эталонной последовательности. Таким образом, один вариант осуществления изобретения



предусматривает молекулу ДНК, содержащую последовательность, которая при оптимальном выравнивании с эталонной последовательностью, представленной в данном документе под SEQ ID NO: 1-20, имеет по меньшей мере около 85 процентов идентичности, по меньшей мере около 86 процентов идентичности, по меньшей мере около 87 процентов идентичности, по меньшей мере около 88 процентов идентичности, по меньшей мере около 89 процентов идентичности, по меньшей мере около 90 процентов идентичности, по меньшей мере около 91 процента идентичности, по меньшей мере около 92 процентов идентичности, по меньшей мере около 93 процентов идентичности, по меньшей мере около 94 процентов идентичности, по меньшей мере около 95 процентов идентичности, по меньшей мере около 96 процентов идентичности, по меньшей мере около 97 процентов идентичности, по меньшей мере около 98 процентов идентичности, по меньшей мере около 99 процентов идентичности или по меньшей мере около 100 процентов идентичности эталонной последовательности.

### **Регуляторные элементы**

[39] Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидерные последовательности (также известные как 5' НТО), энхансеры, интроны и области терминации транскрипции (или 3' НТО), играют неотъемлемую роль в общей экспрессии генов в живых клетках. Термин «регуляторный элемент», используемый в данном документе, относится к молекуле ДНК, обладающей активностью, регулирующей ген. Термин «активность, регулирующая ген», используемый в данном документе, относится к способности влиять на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК, например, путем воздействия на транскрипцию и/или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидерные последовательности, энхансеры, интроны и 3' НТО, которые функционируют в растениях, пригодны для модификации фенотипов растений с помощью генной инженерии.

[40] Используемый в данном документе термин «группа регуляторных элементов экспрессии» или последовательность «EXP» может относиться к группе функционально связанных регуляторных элементов, таких как энхансеры, промоторы, лидеры и интроны. Например, группа регуляторных элементов экспрессии может состоять, например, из промотора, функционально связанного 5' с лидерной последовательностью, функционально связанной 5' с последовательностью интрона. EXP, пригодные для практического применения данного изобретения, включают SEQ ID NO: 5, 9 и 13.

[41] Регуляторные элементы могут характеризоваться их профилем экспрессии генов, например, положительными и/или отрицательными эффектами, такими как конститутивная экспрессия или временная, пространственная, связанная с развитием, тканевая, экологическая, физиологическая, патологическая экспрессия, клеточный цикл и/или химически реагирующая экспрессия, а также любые их комбинации, а также количественными или качественными признаками.. Как используется в данном документе, термин «профиль экспрессии гена» представляет собой любой профиль транскрипции функционально связанной молекулы ДНК в транскрибируемую молекулу РНК. Транскрибируемая молекула РНК может быть транслирована с образованием молекулы белка или может обеспечить антисмысловую или другую регуляторную молекулу РНК, такую как двухцепочечная РНК (дцРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), микроРНК (микроРНК), малая интерферирующая РНК (миРНК) и т.п.

[42] Как используется в данном документе, термин «экспрессия белка» представляет собой любой профиль трансляции транскрибируемой молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессия белка может характеризоваться его временными, пространственными, связанными с развитием или морфологическими качествами, а также количественными или качественными показателями.

[43] Промотор можно использовать в качестве регуляторного элемента для модулирования экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Как используется в данном документе, термин «промотор» обычно относится к молекуле ДНК, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы II и других белков, таких как действующие в транс-положении факторы транскрипции, для инициации транскрипции. Промотор может быть первоначально выделен из 5'-нетранслируемой области (5' НТО) геномной копии гена, или для целей данного описания промоторы, предложенные в настоящем документе, содержат промотор, функционально связанный 5' с лидером. Альтернативно, промоторы могут представлять собой полученные путем синтеза или обработанные молекулы ДНК. Промоторы также могут быть химерными. Химерные промоторы получают путем слияния двух или нескольких гетерологичных молекул ДНК. Промоторы, используемые при осуществлении данного изобретения, включают промоторные элементы, содержащиеся в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах осуществления изобретения заявленные молекулы ДНК и любые их варианты или производные, как описано в

данном документе, далее определяются как обладающие промоторной активностью, т.е. способные действовать в качестве промотора в клетке-хозяине, например, в трансгенном растении. В других конкретных вариантах осуществления фрагмент может быть определен как проявляющий промоторную активность, которой обладает исходная молекула промотора, из которой он получен, или фрагмент может содержать «минимальный промотор», который обеспечивает базовый уровень транскрипции и содержит ТАТА-бокс или эквивалентную последовательность ДНК для распознавания и связывания комплекса РНК-полимеразы II для инициации транскрипции.

[44] В одном варианте осуществления представлены фрагменты промоторной последовательности, раскрытой в данном документе. Фрагменты промотора могут обладать промоторной активностью, как описано выше, и могут использоваться отдельно или в сочетании с другими промоторами и фрагментами промоторов, например, при конструировании химерных промоторов, или в сочетании с другими элементами экспрессии и фрагментами элементов экспрессии. В конкретных вариантах осуществления предложены фрагменты промотора, содержащие по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 175, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 225, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 275, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 750, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900 или по меньшей мере около 1000 последовательных нуклеотидов или более молекулы ДНК, обладающей промоторной активностью, как описано в данном документе. Способы получения таких фрагментов из исходной молекулы промотора хорошо известны в данной области техники.

[45] Композиции, полученные из любого из промоторных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, такие как внутренние или 5'-делетии, например, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, для улучшения или изменения экспрессии, в том числе путем удаления элементов, которые оказывают либо положительное, либо отрицательное влияние на экспрессию; дублирующие элементы, оказывающие положительное или отрицательное влияние на экспрессию; и/или дублирование или удаление элементов, оказывающих ткане- или клеточно-специфическое действие на экспрессию. Композиции, полученные из любого из промоторных элементов, содержащихся в

любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, содержащие 3' делеции, в которых элемент ТАТА-бокс или его эквивалентная последовательность и удаленная нижележащая последовательность могут быть использованы, например, для получения энхансерных элементов. Дальнейшие удаления могут быть сделаны для удаления любых элементов, которые имеют положительные или отрицательные значения; тканеспецифический; клеточно-специфический; или зависящие от времени (такие как, но не ограничиваясь этим, циркадные ритмы) влияют на экспрессию. Любой из промоторных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, и полученные из них фрагменты или энхансеры, можно использовать для получения химерных транскрипционных композиции регулирующих элементов.

[46] В соответствии с изобретением промотор или фрагмент промотора можно анализировать на присутствие известных элементов промотора, т.е. характеристик последовательности ДНК, таких как ТАТА-бокс и другие известные мотивы сайта связывания фактора транскрипции. Идентификация таких известных элементов промотора может быть использована специалистом в данной области для разработки вариантов промотора, имеющих паттерн экспрессии, сходный с исходным промотором.

[47] Как используется в данном документе, термин «лидерная последовательность» относится к молекуле ДНК, выделенной из нетранслируемой 5'-области (5' НТО) гена и определяемой, как правило, как нуклеотидный сегмент между сайтом начала транскрипции (TSS) и сайтом начала последовательности, кодирующей белок. Альтернативно, лидерные последовательности могут представлять собой полученные синтезом или регулируемые элементы ДНК. Лидерную последовательность можно использовать в качестве 5' регуляторного элемента для модулирования экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные молекулы можно использовать с гетерологичным промотором или с их нативным промотором. Лидеры, используемые при осуществлении данного изобретения, включают лидерные элементы, содержащиеся в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах осуществления такие последовательности ДНК могут быть определены как способные действовать в качестве лидера в клетке-хозяине, включая, например, трансгенную растительную клетку. В одном варианте осуществления такие последовательности расшифровываются как содержащие лидерную активность.

[48] Лидерные последовательности (также называемые 5' НТО), содержащиеся в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, могут состоять из

регуляторных элементов или могут принимать вторичные структуры, которые могут влиять на транскрипцию или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные последовательности, содержащиеся в любой из SEQ ID NO:1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19, можно использовать в соответствии с изобретением для получения химерных регуляторных элементов, влияющих на транскрипцию или трансляция функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК.

[49] Как используется в данном документе, термин «интрон» относится к молекуле ДНК, которая может быть выделена или идентифицирована из гена, и может быть определена в целом как область, сплайсированная во время обработки матричной РНК (мРНК) перед трансляцией. Альтернативно, интрон может представлять собой полученный синтезом или регулируемый элемент ДНК. Интрон может содержать энхансерные элементы, влияющие на транскрипцию функционально связанных генов. Интрон можно использовать в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Конструкция может содержать интрон, причем интрон может быть или не быть гетерологичным по отношению к транскрибируемой молекуле ДНК. Примеры интронов в данной области техники включают интрон актина риса и интрон HSP70 кукурузы.

[50] У растений включение некоторых интронов в генные конструкции приводит к повышенному накоплению мРНК и белков по сравнению с конструкциями, в которых интрон отсутствует. Этот эффект получил название «интрон-опосредованное усиление» (IME) экспрессии генов. Интроны, которые, как известно, стимулируют экспрессию в растениях, были идентифицированы в генах кукурузы (например, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* и *Ubi1*), в генах риса (например, *tri*) и в генах двудольных растений, таких как гены петунии (например, *gbcS*), картофеля (например, *st-ls1*) и из *Arabidopsis thaliana* (например, *ubq3* и *pat1*). Было показано, что делеции или мутации в сайтах сплайсинга интрона снижают экспрессию генов, указывая на то, что сплайсинг может быть необходим для IME. Однако IME у двудольных растений был показан точечными мутациями в сайтах сплайсинга гена *pat1* от *A. thaliana*. Было показано, что многократное использование одного и того же интрона в одном растении имеет недостатки. В этих случаях необходимо иметь набор основных контрольных элементов для конструирования соответствующих элементов рекомбинантной ДНК. Примеры интронов, которые можно использовать при осуществлении данного изобретения, представлены в виде SEQ ID NO: 7, 11 и 15.

[51] Как используется в данном документе, термины «3'-молекула терминации транскрипции», «3'-нетранслируемая область» или «3' НТО» относятся к молекуле ДНК, которая используется во время транскрипции в нетранслируемой области 3'-части молекулы мРНК. 3'-нетранслируемая область молекулы мРНК может быть  
5 получена путем специфического расщепления и 3'-полиаденилирования, также известного как полиА-хвост. 3' НТО может быть функционально связана с транскрибируемой молекулой ДНК и располагаться ниже транскрибируемой молекулы ДНК и может включать сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, способные влиять на транскрипцию, обработку мРНК или экспрессию генов.  
10 Считается, что полиА-хвосты участвуют в обеспечении стабильности мРНК и в инициации трансляции. Примеры 3' молекул терминации транскрипции в данной области представляют собой 3' область нопалинсинтазы, 3' область hsp17 пшеницы, 3' область малой субъединицы рубиско гороха, 3' область Е6 хлопка и 3' НТО коиксина.

[52] 3' НТО обычно находят полезное применение для рекомбинантной экспрессии  
15 определенных молекул ДНК. Слабая 3' НТО может генерировать считывание, которое может повлиять на экспрессию молекулы ДНК, расположенной в соседних экспрессионных кассетах. Надлежащий контроль терминации транскрипции может предотвратить считывание в последовательностях ДНК (например, других кассет экспрессии), расположенных ниже по ходу транскрипции, и может дополнительно  
20 обеспечить эффективную рециркуляцию РНК-полимеразы для улучшения экспрессии генов. Эффективная терминация транскрипции (высвобождение РНК-полимеразы II из ДНК) является предпосылкой для повторной инициации транскрипции и, таким образом, непосредственно влияет на общий уровень транскрипта. После терминации транскрипции зрелая мРНК высвобождается из места синтеза, а матрица  
25 транспортируется в цитоплазму. Эукариотические мРНК накапливаются в виде поли(А)-форм *in vivo*, что затрудняет обнаружение сайтов терминации транскрипции обычными методами. Однако предсказание функциональных и эффективных 3' НТО методами биоинформатики затруднено из-за отсутствия консервативных последовательностей ДНК, которые позволили бы легко предсказать эффективную 3'  
30 НТО.

[53] С практической точки зрения обычно выгодно, чтобы 3' НТО, используемая в кассете экспрессии, обладала следующими характеристиками. Во-первых, 3' НТО должна быть способна эффективно и действенно терминировать транскрипцию трансгена и предотвращать считывание транскрипта в любую соседнюю

последовательность ДНК, которая может содержать другую кассету экспрессии, как в случае множественных кассет экспрессии, находящихся в одной транспортной ДНК (Т-ДНК) или соседняя хромосомная ДНК, в которую вставлена Т-ДНК. Во-вторых, 3' НТО не должна вызывать снижения транскрипционной активности, придаваемой промотором, лидером, энхансерами и интронами, которые используются для управления экспрессией молекулы ДНК. Наконец, в биотехнологии растений 3' НТО часто используется для запуска реакций амплификации обратной транскрибированной РНК, выделенной из трансформированного растения, и используется для: (1) оценки транскрипционной активности или экспрессии экспрессионной кассеты после ее интеграции в хромосому растения; (2) оценки количества копий вставок в ДНК растения; и (3) оценки зиготности полученного семени после скрещивания. 3' НТО также используется в реакциях амплификации ДНК, выделенной из трансформированного растения, для характеристики целостности вставленной кассеты. 3' НТО, пригодные для практического применения данного изобретения, представлены как SEQ ID NO:2, 4, 8, 12, 16 и 20.

[54] Как используется в данном документе, термин «энхансер» или «энхансерный элемент» относится к действующему в *цис*-положении регуляторному элементу, также известному как *цис*-элемент, который придает аспект общего профиля экспрессии, но обычно сам по себе недостаточен для управления транскрипцией функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. В отличие от промоторов, энхансерные элементы обычно не включают сайт начала транскрипции (TSS) или ТАТА-бокс или эквивалентную последовательность ДНК. Промотор или фрагмент промотора может природным образом содержать один или несколько энхансерных элементов, влияющих на транскрипцию функционально связанной последовательности ДНК. Энхансерный элемент также может быть слит с промотором с образованием *цис*-элемента химерного промотора, который придает аспект общей модуляции экспрессии гена.

[55] Считается, что многие энхансерные элементы промотора связываются с ДНК-связывающими белками и/или влияют на топологию ДНК, создавая локальные конформации, которые выборочно разрешают или ограничивают доступ РНК-полимеразы к матрице ДНК или способствуют избирательному открытию двойной спирали в месте инициации транскрипции. Энхансерный элемент может функционировать для связывания факторов транскрипции, которые регулируют транскрипцию. Некоторые энхансерные элементы связывают более одного фактора транскрипции, а факторы транскрипции могут взаимодействовать с различной

аффинностью с более чем одним энхансерным доменом. Энхансерные элементы могут быть идентифицированы рядом методов, включая делеционный анализ, т.е. удаление одного или более нуклеотидов с 5' конца или внутри промотора; анализ ДНК-связывающего белка с использованием футпринтинга ДНКазы I, интерференции метилирования, анализов электрофореза сдвига подвижности, геномного футпринтинга *in vivo* с помощью полимеразной цепной реакции, опосредованной лигированием (ПЦР), и других традиционных анализов или анализа сходства последовательностей ДНК с использованием известных *cis*-элементных мотивов или энхансерных элементов в виде целевой последовательности или целевого мотива с помощью традиционных методов сравнения последовательностей ДНК, таких как BLAST. Тонкую структуру энхансерного домена можно дополнительно изучить путем мутагенеза (или замены) одного или более нуклеотидов или другими обычными способами, известными в данной области техники. Энхансерные элементы могут быть получены химическим синтезом или путем выделения из регуляторных элементов, которые включают такие элементы, и они могут быть синтезированы с дополнительными фланкирующими нуклеотидами, которые содержат полезные сайты рестрикционных ферментов для облегчения последующих манипуляций. Таким образом, проектирование, конструирование и применение энхансерных элементов в соответствии с раскрытыми в данном документе способами для модулирования экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК охватываются изобретением. Энхансеры могут быть получены из любых промоторов, содержащихся в SEQ ID NO:1, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18 и 19.

[56] Используемый в данном документе термин «химерный» относится к одиночной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, где ни первая, ни вторая молекула ДНК обычно не встречаются в такой конфигурации, т.е. слитыми с другой молекулой. Таким образом, химерная молекула ДНК представляет собой новую молекулу ДНК, обычно не встречающуюся в природе. Используемый в данном документе термин «химерный промотор» относится к промотору, полученному посредством такой манипуляции с молекулами ДНК. Химерный промотор может объединять два или более фрагментов ДНК, например, слияние промотора с энхансерным элементом. Таким образом, проектирование, конструирование и применение химерных промоторов в соответствии с раскрытыми в данном документе способами для модулирования экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК охватываются данным изобретением.



[57] Химерные регуляторные элементы могут быть сконструированы так, чтобы содержать различные составные элементы, которые могут быть функционально связаны различными способами, известными в данной области техники, такими как расщепление и лигирование рестрикционными ферментами, независимое от лигирования клонирование, модульная сборка продуктов ПЦР во время амплификации или прямой химический синтез регуляторного элемента, а также другие способы, известные в данной области техники. Полученные в результате различные химерные регуляторные элементы могут содержать одни и те же или варианты одних и тех же составляющих элементов, но отличаться последовательностью ДНК или последовательностями ДНК, которые содержат связывающую последовательность ДНК, или последовательностями, которые позволяют составным частям быть функционально связанными. В изобретении последовательности ДНК, представленные как SEQ ID NO: 1-20, могут представлять собой эталонные последовательности регуляторных элементов, где составные элементы, составляющие эталонную последовательность, могут быть соединены способами, известными в данной области техники, и могут включать замены, делеции и/или вставки одного или более нуклеотидов или мутации, которые естественным образом возникают при трансформации клеток бактерий и растений.

[58] Используемый в данном документе термин «вариант» относится ко второй молекуле ДНК, такой как регуляторный элемент, которая по составу аналогична, но не идентична первой молекуле ДНК, и при этом вторая молекула ДНК по-прежнему сохраняет общую функциональность, т.е. такой же или сходный паттерн экспрессии, например, посредством более или менее эквивалентной транскрипционной активности первой молекулы ДНК. Вариант может представлять собой более короткую или укороченную версию первой молекулы ДНК или измененную версию последовательности первой молекулы ДНК, например, с другими сайтами рестрикционных ферментов и/или внутренними делециями, заменами или вставками. «Вариант» также может охватывать регуляторный элемент, имеющий нуклеотидную последовательность, содержащую замену, делецию или вставку одного или более нуклеотидов эталонной последовательности, при этом производный регуляторный элемент обладает большей или меньшей или эквивалентной транскрипционной или трансляционной активностью, чем соответствующая родительская регуляторная молекула. «Варианты» регуляторного элемента также включают варианты, возникающие в результате мутаций, которые естественным образом возникают при

трансформации клеток бактерий и растений. В данном изобретении полинуклеотидная последовательность, представленная как SEQ ID NO:1-20, может быть использована для создания вариантов, сходных по составу, но не идентичных последовательности ДНК исходного регуляторного элемента, при сохранении общей функциональности. т. е. такого же или подобного паттерна экспрессии исходного регуляторного элемента. Получение таких вариантов изобретения находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники в свете раскрытия и входит в объем изобретения.

[59] Эффективность модификаций, дупликаций или делеций, описанных в данном документе, в отношении желаемых аспектов экспрессии конкретного трансгена может быть проверена эмпирически в анализах стабильных и транзиентных растений, таких как те, что описаны в рабочих примерах в данном документе, чтобы подтвердить результаты, которые может варьировать в зависимости от произведенных изменений и цели изменения исходной молекулы ДНК.

### 15 **Конструкции**

[60] Как используется в данном документе, термин «конструкция» означает любую рекомбинантную молекулу ДНК, такую как плазида, космида, вирус, фаг, или линейная или кольцевая молекула ДНК или РНК, полученная из любого источника, способная к геномной интеграции или автономной репликации, содержащего молекулу ДНК, в которой по меньшей мере одна молекула ДНК функционально соединена с другой молекулой ДНК, т.е. функционально связана. Как используется в данном документе, термин «вектор» означает любую конструкцию, которая может использоваться с целью трансформации, то есть введения гетерологичной ДНК или РНК в клетку-хозяин. Конструкция обычно включает одну или более экспрессионных кассет. Используемый в данном документе термин «кассета экспрессии» относится к молекуле ДНК, содержащей по меньшей мере транскрибируемую молекулу ДНК, функционально связанную с одним или несколькими регуляторными элементами, как правило, по меньшей мере с промотором и 3' НТО.

[61] Как используется в данном документе, термин «функционально связанный» относится к первой молекуле ДНК, присоединенной ко второй молекуле ДНК, где первая и вторая молекулы ДНК расположены таким образом, что первая молекула ДНК влияет на функцию второй молекулы ДНК. Две молекулы ДНК могут быть или не быть частью одной смежной молекулы ДНК и могут быть или не быть смежными. Например, промотор функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, если

промотор модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой молекулы ДНК в клетке. Например, лидерная последовательность функционально связана с последовательностью ДНК, когда она может влиять на транскрипцию или трансляцию последовательности ДНК.

5 [62] Конструкции по изобретению могут быть предоставлены в одном варианте осуществления в виде двойных индуцирующих опухоль (Ti) граничных конструкций плазмиды, которые имеют правую граничную (RB или AGRtu.RB) и левую граничную (LB или AGRtu.LB) области Ti плазмиды, выделенной из *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей T-ДНК, которая вместе с транспортными молекулами, обеспечиваемыми  
10 клетками *A. tumefaciens*, обеспечивает интеграцию T-ДНК в геном растительной клетки (см., например, патент США 6603061). Конструкции также могут содержать сегменты ДНК каркаса плазмиды, которые обеспечивают функцию репликации и отбор с помощью антибиотиков в бактериальных клетках, например, точку начала репликации *Escherichia coli*, такую как ori322, точку начала репликации широкого круга хозяев,  
15 такую как oriV или oriRi, и кодирующую область для селективируемого маркера, такого как Spec/Strp, который кодирует аминогликозидаденилтрансферазу Tn7 (*aadA*), придающую устойчивость к спектиномицину или стрептомицину, или селективируемый маркерный ген гентамицина (Gm, Gent). Для трансформации растений бактериальный штамм-хозяин часто представляет собой *A. tumefaciens* ABI, C58 или LBA4404, однако  
20 другие штаммы, известные специалистам в области трансформации растений, могут использоваться в изобретении.

[63] В данной области техники известны способы сборки и введения конструкций в клетку таким образом, чтобы транскрибируемая молекула ДНК транскрибировалась в функциональную молекулу мРНК, которая транслируется и экспрессируется как белок.  
25 Для практического применения изобретения традиционные композиции и способы получения и использования конструкций и клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники. Типичные векторы, подходящие для экспрессии нуклеиновых кислот в высших растениях, хорошо известны в данной области техники и включают векторы, полученные из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* и вектора контроля переноса pCaMV CN.  
30

[64] В конструкцию могут быть включены различные регуляторные элементы, включая любые из представленных в данном документе. Любые такие регуляторные элементы могут быть предоставлены в комбинации с другими регуляторными элементами. Такие комбинации могут быть разработаны или модифицированы для

получения необходимых регуляторных свойств. В одном варианте осуществления конструкции по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с транскрибируемой молекулой ДНК, функционально связанной с 3' НТО.

5 [65] Конструкции по настоящему изобретению могут включать любой промотор или лидерную последовательность, представленные в данном документе или известные в данной области. Например, промотор по изобретению может быть функционально связан с гетерологичной нетранслируемой 5'-лидерной последовательностью, такой как лидерная последовательность, полученная из гена белка теплового шока.  
10 Альтернативно лидерная последовательность по изобретению может быть функционально связана с гетерологичным промотором, таким как промотор транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты.

[66] Кассеты экспрессии могут также включать последовательность, кодирующую транзитный пептид, которая кодирует пептид, пригодный для внутриклеточного  
15 нацеливания на функционально связанный белок, в частности, на хлоропласт, лейкопласт или другую пластидную органеллу; митохондрии; пероксисому; вакуоль; или внеклеточное расположение. Многие белки, локализованные в хлоропластах, экспрессируются из ядерных генов в качестве предшественников и доставляются в хлоропласт с помощью транзитного пептида хлоропласта (СТР). Примеры таких  
20 выделенных белков хлоропластов включают, но не ограничиваются ими, белки, связанные с малой субъединицей (SSU) рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксин, ферредоксин-оксидоредуктазу, светособирающий сложный белок I и белок II, тиоредоксин F и энолпирувилшिकиматфосфатсинтазу (EPSPS). Транзитные пептиды хлоропластов описаны, например, в патенте США № 7193133. Было  
25 продемонстрировано, что нехлоропластные белки могут быть нацелены на хлоропласт посредством экспрессии гетерологичного СТР, функционально связанного с трансгеном, кодирующим нехлоропластные белки.

### **Транскрибируемые молекулы ДНК**

[67] Как используется в данном документе, термин «транскрибируемая молекула  
30 ДНК» относится к любой молекуле ДНК, способной транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые имеют последовательности, кодирующие белок, те, которые кодируют направляющие РНК, и те, которые продуцируют молекулы РНК, имеющие последовательности, подходящие для супрессии гена. Тип молекулы ДНК может включать, помимо прочего, молекулу ДНК

того же растения, молекулу ДНК другого растения, молекулу ДНК другого организма или синтетическую молекулу ДНК, такую как молекула ДНК, содержащая антисмысловой сигнал гена, или молекула ДНК, кодирующая искусственную, синтетическую или иным образом модифицированную версию трансгена. Типичные транскрибируемые молекулы ДНК для включения в конструкции по изобретению включают, *например*, молекулы ДНК или гены видов, отличных от видов, в которые введена молекула ДНК, или генов, происходящих из или присутствующих в тех же видах, но введены в клетки-реципиенты методами генной инженерии, а не классическими методами селекции.

10 [68] «Трансген» относится к транскрибируемой молекуле ДНК, гетерологичной клетке-хозяину по меньшей мере в отношении ее расположения в геноме клетки-хозяина, и/или транскрибируемой молекуле ДНК, искусственно включенной в геном клетки-хозяина в настоящем или любом предыдущем поколении клетки.

15 [69] Регуляторный элемент, такой как промотор по изобретению, может быть функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, гетерологичной по отношению к регуляторному элементу. Используемый в данном документе термин «гетерологичный» относится к комбинации двух или более молекул ДНК, когда такая комбинация обычно не встречается в природе. Например, две молекулы ДНК могут происходить от разных видов и/или две молекулы ДНК могут происходить от разных генов, *например*, разных генов одного и того же вида или одних и тех же генов разных видов. Таким образом, регуляторный элемент является гетерологичным по отношению к функционально связанной транскрибируемой молекуле ДНК, если такая комбинация обычно не встречается в природе, то есть транскрибируемая молекула ДНК не встречается в природе функционально связанной с регуляторным элементом.

20 [70] Транскрибируемая молекула ДНК, как правило, может представлять собой любую молекулу ДНК, для которой желательна экспрессия транскрипта. Такая экспрессия транскрипта может привести к трансляции полученной молекулы мРНК и, таким образом, к экспрессии белка. В качестве альтернативы, например, транскрибируемая молекула ДНК может быть сконструирована так, чтобы в конечном итоге вызвать снижение экспрессии определенного гена или белка. В одном варианте осуществления этого можно достичь с помощью транскрибируемой молекулы ДНК, ориентированной в антисмысловом направлении. Специалист в данной области техники знаком с использованием такой антисмысловой технологии. Любой ген может быть отрицательно отрегулирован таким образом, и в одном варианте осуществления

транскрибируемая молекула ДНК может быть сконструирована для супрессии конкретного гена посредством экспрессии молекулы дцРНК, миРНК или микроРНК.

[71] Таким образом, один вариант осуществления изобретения представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую регуляторный элемент по изобретению, такой как те, что представлены в виде SEQ ID NO: 1-20, функционально связанные с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, чтобы модулировать транскрипцию молекулы транскрибируемой ДНК на желаемом уровне или в желаемом образце, когда конструкция интегрирована в геном трансгенной растительной клетки. В одном варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК содержит кодирующую белок область гена, а в другом варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК содержит антисмысловую область гена.

### **Гены, представляющие агрономический интерес**

[72] Транскрибируемая молекула ДНК может представлять собой ген, представляющий агрономический интерес. Используемый в данном документе термин «ген, представляющий агрономический интерес», относится к транскрибируемой молекуле ДНК, которая при экспрессии в определенной растительной ткани, клетке или типе клеток придает желаемую характеристику. Продукт гена, представляющего агрономический интерес, может действовать внутри растения, чтобы оказывать влияние на морфологию, физиологию, рост, развитие, урожайность, состав зерна, профиль питания, устойчивость к болезням или вредителям и/или устойчивость к окружающей среде или химическим веществам, или может действовать как пестицид в рационе вредителя, питающегося растением. В одном варианте осуществления изобретения регуляторный элемент по изобретению включен в конструкцию таким образом, что регуляторный элемент функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, которая представляет собой ген, представляющий агрономический интерес.. В трансгенном растении, содержащем такую конструкцию, экспрессия гена, представляющего агрономический интерес, может придавать полезный агрономический признак. Полезный агрономический признак может включать, например, помимо прочего, устойчивость к гербицидам, борьбу с насекомыми, модифицированную урожайность, устойчивость к болезням, устойчивость к патогенам, модифицированный рост и развитие растений, модифицированное содержание крахмала, модифицированное содержание масла, модифицированное содержание жирных кислот, модифицированное содержание белка, модифицированное созревание фруктов, улучшенная питательность для животных и человека, производство

биополимеров, устойчивость к стрессам окружающей среды, фармацевтические пептиды, улучшенные технологические качества, улучшенный вкус, полезность для производства гибридных семян, улучшенное производство волокон и желаемое производство биотоплива.

- 5 [73] Примеры генов, представляющих агрономический интерес, известные в данной области техники, включают те, которые обеспечивают устойчивость к гербицидам (патенты США № 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435 и 5,463,175), повышение урожайности (патенты США № USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 10 6,235,971; 6,222,098 и 5,716,837), борьбу с насекомыми (патенты США № 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658, 15 5,880,275; 5,763,245 и 5,763,241), устойчивость к грибным заболеваниям (патенты США № 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407 и 6,506,962), устойчивость к вирусам (патенты США № 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023 и 5,304,730), устойчивость к нематодам (патенты США № 6,228,992), устойчивость к бактериальным заболеваниям (патент США № 5,516,671), 20 рост и развитие растений (патенты США № 6,723,897 и 6,518,488), продуцирование крахмала (патенты США № 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), модифицированное продуцирование масла (патенты США № 6,444,876; 6,426,447 и 6,380,462), повышенное продуцирование масел (патенты США № 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008 и 6,476,295), модифицированное содержание жирных кислот (патенты США 25 № 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461 и 6,459,018), высокое продуцирование белка (патент США № 6,380,466), созревание фруктов (патент США № 5,512,466), улучшенная пищевая ценность для животных и человека (патенты США № 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; и 6,171,640), биополимеры (патенты США № USRE37,543; 6,228,623; и 5,958,745, и 30 6,946,588), стрессоустойчивость к факторам окружающей среды (патент США № 6,072,103), фармацевтические пептиды и секретируемые пептиды (патенты США № 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075 и 6,080,560), улучшенные характеристики созревания (патент США № 6,476,295), улучшенная усвояемость (патент США № 6,531,648) низкий уровень рафинозы (патент США № 6,166,292), промышленное производство

ферментов (патент США № 5,543,576), улучшенный вкус (патент США № 6,011,199), фиксация азота (патент США № 5,229,114), продуцирование гибридных семян (патент США № 5,689,041), продуцирование волокна (патенты США № 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834 и 5,869,720) и продуцирование биотоплива (патент США № 5,998,700).

5 [74] В качестве альтернативы ген, представляющий агрономический интерес, может  
 10 влиять на указанные выше характеристики или фенотипы растений, кодируя молекулу РНК, которая вызывает целенаправленную модуляцию экспрессии гена эндогенного гена, например, с помощью антисмысловой (см., например, патент США 5107065); ингибирующей РНК (“РНКи,” включая модуляцию экспрессии генов микроРНК-,  
 15 миРНК-, транс-действующая миРНК- и поэтапные механизмы, опосредованные шРНК, например, как описано в опубликованных заявках США 2006/0200878 и U.S. 2008/0066206, и в патентной заявке США 11/974,469); или механизмы, опосредованные косупрессией. РНК также может представлять собой каталитическую молекулу РНК (например, рибозим или рибопереключател; см., например, патент США  
 20 2006/0200878), сконструированную для расщепления желаемого эндогенного продукта мРНК. В данной области техники известны способы конструирования и введения конструкций в клетку таким образом, что транскрибируемая молекула ДНК транскрибируется в молекулу, способную вызывать супрессию гена.

### **Селектируемые маркеры**

20 [75] Трансгены селектируемых маркеров также можно использовать с регуляторными элементами по изобретению. Используемый в данном документе термин «трансген селектируемого маркера» относится к любой транскрибируемой молекуле ДНК, экспрессию которой в трансгенном растении, ткани или клетке или ее  
 25 отсутствие можно каким-либо образом подвергнуть скринингу или оценить. Селектируемые маркерные гены и связанные с ними методы селекции и скрининга для использования при практическом осуществлении изобретения известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, транскрибируемые молекулы ДНК, кодирующие β-глюкуронидазу (GUS), зеленый флуоресцентный белок (GFP), белки, придающие устойчивость к антибиотикам, и белки, придающие устойчивость к гербицидам. Пример трансгена селектируемого маркера представлен как SEQ ID  
 30 NO:21.

### **Редактирование генома**

[76] Несколько вариантов осуществления относятся к конструкции рекомбинантной ДНК, содержащей экспрессионную(ые) кассету(ы), содержащую последовательность,



по меньшей мере на около 85 % идентичную любой из SEQ ID NO:1-20, или ее фрагмент, функционально связанный с гетерологичной последовательностью ДНК, кодирующей сайт-специфический фермент модификации генома и/или любой ассоциированный(е) белок(и) для осуществления модификации генома. Эти кассеты, экспрессирующие нуклеазу, могут присутствовать в той же молекуле или векторе, что и донорная матрица для матричного редактирования (в цис), или в отдельной молекуле или векторе (в транс). В данной области техники известно несколько способов редактирования, включающих различные специфичные для последовательности ферменты модификации генома (или комплексы белков и/или направляющих РНК), которые модифицируют геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический фермент модификации генома модифицирует геном, индуцируя двухцепочечный разрыв (DSB) или разрыв в желаемом геномном сайте или локусе. В некоторых вариантах осуществления в процессе восстановления DSB или одноцепочечных разрезов, введенных ферментом модификации генома, донорная матричная ДНК может интегрироваться в геном в месте DSB или одноцепочечного разрезания. В некоторых вариантах осуществления в процессе восстановления DSB или одноцепочечного разрезания, введенного ферментом модификации генома, в геном может быть введена инсерционная или делеционная мутация (indel). В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический фермент модификации генома включает цитидиндезаминазу. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический фермент модификации генома включает адениндезаминазу. В данном изобретении сайт-специфические ферменты модификации генома включают эндонуклеазы, рекомбиназы, транспозазы, деаминазы, хеликазы, обратные транскриптазы и любую их комбинацию.

[77] Несколько вариантов осуществления относятся к регуляторному элементу гена, как описано в данном документе, функционально связанному с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, кодирующей один или более компонентов системы редактирования генома. Системы редактирования генома можно использовать для введения одной или более вставок, делеций, замен, модификаций оснований, транслокаций или инверсий в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ген-регуляторный элемент, как описано в данном документе, функционально связан с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, кодирующей специфичный для последовательности ДНК-связывающий домен, такой как эффекторный белок CRISPR-Cas, белок цинкового пальца или белок активатора

транскрипции (TAL). В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, специфичный к последовательности, может представлять собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления ген-регуляторный элемент, описанный в данном документе, функционально связан с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, кодирующей эффекторный белок CRISPR-Cas. В некоторых вариантах осуществления эффекторный белок CRISPR-Cas выбран из системы CRISPR-Cas типа I, системы CRISPR-Cas типа II, системы CRISPR-Cas типа III, системы CRISPR-Cas типа IV, системы CRISPR-Cas типа V или системы CRISPR-Cas типа VI. В некоторых вариантах осуществления ген-регуляторный элемент, как описано в данном документе, функционально связан с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, кодирующей направляющую РНК. Используемый в данном документе термин «направляющая РНК» или «гРНК» относится к РНК, которая распознает целевую последовательность ДНК и направляет или «нацеливает» эффекторный белок CRISPR к целевой последовательности ДНК. Направляющая РНК состоит из области, комплементарной ДНК-мишени (называемой сгРНК), и области, связывающей эффекторный белок CRISPR (называемой тгасгРНК). Направляющая РНК может представлять собой одну молекулу РНК (огРНК) или две отдельные молекулы РНК (двухкомпонентная гРНК). В некоторых вариантах осуществления гРНК может дополнительно содержать матрицу РНК (пегРНК) для обратной транскриптазы.

[78] Несколько вариантов осуществления относятся к ген-регуляторному элементу, как описано в данном документе, функционально связанному с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК, кодирующей один или более компонентов системы редактирования генома CRISPR-Cas, включающей эффекторный белок CRISPR-Cas и направляющую РНК. Примеры эффекторных белков CRISPR-Cas включают, помимо прочего, эффекторные белки Cas9, C2c1, C2c3, C2c4, C2c5, C2c8, C2c9, C2c10, Cas12a (также известен как Cpf1), Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas12h, Cas12i, Cas12g, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3'', Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известен как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Csel, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), Csf5, Cas14a, Cas14b и Cas14c. В некоторых вариантах осуществления ген-регуляторный элемент, как описано в данном документе, функционально связан с эффекторным белком CRISPR-Cas, содержащим мутацию в его нуклеазно-активном сайте (например, RuvC, HNH, например, RuvC-сайт нуклеазного домена Cas12a;

например, RuvC-сайт и/или сайт HNH домена нуклеазы Cas9). Эффекторный белок CRISPR-Cas, имеющий мутацию в своем нуклеазно-активном сайте и, следовательно, больше не обладающий нуклеазной активностью, обычно называют «мертвым», например, dCas. В некоторых вариантах осуществления домен или полипептид эффекторного белка CRISPR-Cas, имеющий мутацию в своем активном сайте нуклеазы, может иметь нарушенную или сниженную активность по сравнению с тем же эффекторным белком CRISPR-Cas без мутации. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент гена, как описано в данном документе, функционально связан с эффекторным белком CRISPR-Cas, имеющим мутацию в своем нуклеазно-активном сайте для создания неказовой активности, функционально связанной с ферментом обратной транскриптазы.

### **Трансформация клеток**

[79] Изобретение также направлено на способ получения трансформированных клеток и растений, которые содержат один или несколько регуляторных элементов, функционально связанных с транскрибируемой молекулой ДНК.

[80] Термин «трансформация» относится к введению молекулы ДНК в хозяина-реципиента. Используемый в данном документе термин «хозяин» относится к бактериям, грибам или растениям, включая любые клетки, ткани, органы или потомство бактерий, грибов или растений. Ткани и клетки растений, представляющие особый интерес, включают протопласты, каллусы, корни, клубни, семена, стебли, листья, проростки, зародыши и пыльцу.

[81] Как используется в данном документе термин «трансформированный» относится к клетке, ткани, органу или организму, в который была введена чужеродная молекула ДНК, такая как конструкция. Введенная молекула ДНК может быть вставлена в геномную ДНК реципиентных клетки, ткани, органа или организма таким образом, что введенная молекула ДНК наследуется последующим потомством. «Трансгенная» или «трансформированная» клетка или организм может также включать потомство клетки или организма и потомство, полученное в результате программы скрещивания, в которой такой трансгенный организм используется в качестве родителя в скрещивании и проявляет измененный фенотип в результате присутствия чужеродной молекулы ДНК. Введенная молекула ДНК также может временно вводиться в клетку-реципиент, так что введенная молекула ДНК не наследуется последующим потомством. Термин «трансгенный» относится к бактерии, грибку или растению, содержащему одну или несколько гетерологичных молекул ДНК.

[82] Специалистам в данной области техники хорошо известно много способов введения молекул ДНК в клетки растений. Процесс обычно включает этапы выбора подходящей клетки-хозяина, трансформации клетки-хозяина вектором и получения трансформированной клетки-хозяина. Способы и материалы для трансформации клеток растений путем введения растительной конструкции в геном растения при осуществлении на практике настоящего изобретения могут включать любой из хорошо известных и продемонстрированных способов. Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, бактериальную инфекцию (например, *Agrobacterium*), бинарные ВАС-векторы, прямую доставку ДНК (например, с помощью ПЭГ-опосредованной трансформации, опосредованного высущиванием/ингибированием поглощения ДНК, электропорации, перемешивания с волокнами карбида кремния и ускорения частиц, покрытых ДНК), редактирование генов (например, системы CRISPR-Cas), среди прочего.

[83] Клетки-хозяева могут представлять собой любую клетку или организм, например клетку растения, клетку водоросли, водоросль, клетку гриба, гриб, клетку бактерии или клетку насекомого. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева и трансформированные клетки могут включать клетки культурных растений.

[84] Трансгенное растение впоследствии может быть регенерировано из клетки трансгенного растения по изобретению. Используя обычные методы селекции или самоопыление, из этого трансгенного растения можно получить семена. Такие семена и полученное потомство растения, выращенного из таких семян, будут содержать молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению и, следовательно, будут трансгенными.

[85] Трансгенные растения по настоящему изобретению могут самоопыляться для получения семян гомозиготных трансгенных растений по настоящему изобретению (гомозиготных по молекуле рекомбинантной ДНК) или скрещиваться с нетрансгенными растениями или другими трансгенными растениями для получения семян для гетерозиготных трансгенных растений по настоящему изобретению (гетерозиготных по рекомбинантной молекуле ДНК). Как гомозиготные, так и гетерозиготные трансгенные растения упоминаются в данном документе как «растения-потомки». Растения-потомки представляют собой трансгенные растения, происходящие от исходного трансгенного растения и содержащие молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению. Семена, полученные с использованием трансгенного растения по настоящему изобретению, можно собирать и использовать для

выращивания поколений трансгенных растений, т.е. растений-потомков по настоящему изобретению, содержащих конструкцию по настоящему изобретению и экспрессирующих ген, представляющий агрономический интерес. Описания способов селекции, которые обычно используются для разных культур, можно найти в одном из  
5 нескольких справочных изданий, *см., например*, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249  
10 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

[86] Трансформированные растения можно анализировать на наличие гена или генов, представляющих интерес, и уровня и/или профиля экспрессии, придаваемых регуляторными элементами по настоящему изобретению. Специалистам в данной  
15 области техники известны многочисленные способы, доступные для анализа трансформированных растений. Например, способы анализа растений включают, но не ограничиваются ими, саузерн-блоттинг или нозерн-блоттинг, подходы на основе ПЦР, биохимические анализы, методы фенотипического скрининга, оценки в условиях эксплуатации и иммунодиагностические анализы. Экспрессию транскрибируемой  
20 молекулы ДНК можно измерить с использованием реагентов и методов TaqMan® (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния), как описано производителем, и времени до порогового цикла ПЦР, определенного с использованием матрицы тестирования TaqMan®. В качестве альтернативы для оценки экспрессии трансгена можно использовать реагенты и методы Invader® (Third Wave Technologies, Мэдисон,  
25 Висконсин), описанные производителем.

[87] Настоящее изобретение также относится к частям растения по изобретению. Части растений включают, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, клубни, семена, эндосперм, семечки и пыльцу. Части растений по изобретению могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми и/или нерегенерируемыми.  
30 Настоящее изобретение также включает и предусматривает трансформированные клетки растений, содержащие молекулу ДНК по изобретению. Трансформированные клетки или клетки трансгенных растений по настоящему изобретению включают регенерируемые и/или нерегенерируемые клетки растений.

[88] Настоящее изобретение также относится к товарному продукту, полученному из трансгенного растения или его части, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Товарные продукты по изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащее последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-20. Как используется в данном документе, термин «товарный продукт» относится к любой композиции или продукту, состоящему из материала, полученного из трансгенного растения, семени, клетки растения или части растения, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Товарные продукты включают, помимо прочего, переработанные семена, зерна, части растений и муку. Товарный продукт по изобретению будет содержать обнаруживаемое количество ДНК, соответствующее рекомбинантной молекуле ДНК по изобретению. Обнаружение одной или нескольких таких ДНК в образце может быть использовано для определения состава или источника товарного продукта. Можно использовать любой стандартный метод обнаружения молекул ДНК, включая раскрытые в данном документе способы обнаружения.

[89] Настоящее изобретение может быть легче понято со ссылкой на следующие примеры, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения, если не указано иное. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что способы, раскрытые в следующих примерах, представляют собой способы, обнаруженные изобретателями, которые хорошо действуют при практическом применении изобретения. Тем не менее, специалисты в данной области техники должны, в свете настоящего раскрытия, понимать, что многие изменения могут быть внесены в раскрытые конкретные варианты осуществления, и все же получить подобный или аналогичный результат, не отходя от сущности и объема изобретения, поэтому весь материал, изложенный или показанный, следует понимать как иллюстративный, а не как ограничивающий.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### **Идентификация и клонирование регуляторных элементов**

30

[90] Этот пример описывает идентификацию, синтез и клонирование регуляторных элементов экспрессии, полученных из *Zea mays*.

[91] Гены с предпочтительной экспрессией в пыльце, были идентифицированы с использованием общедоступных и собственных данных транскриптома. Каждый локус

гена был изучен биоинформатически, и были идентифицированы соответствующие промоторы, лидеры, интроны и 3' НТО генов. Идентифицированные EXP, промоторы/лидеры, интроны и 3' НТО представлены в таблице 1 ниже.

**Таблица 1. Группы регуляторных элементов экспрессии, промоторы, лидеры, интроны и 3' НТО.**

5

Примечание	SEQ ID NO:	Размер (п. о.)	Описание и/или регуляторные элементы EXP, связанные в направлении 5' → 3' (SEQ ID NO):
P-Zm.GRMZM2G487322:2	1	1973	Промотор + лидер
T-Zm.GRMZM2G487322:2	2	501	3' НТО
P-Zm.GRMZM2G339781:1	3	1998	Промотор + лидер
T-Zm.GRMZM2G339781:1	4	501	3' НТО
EXP-Zm.Xet:1	5	2196	EXP: P-Zm.Xet:1 (SEQ ID NO:6, I-Zm.Xet:1 (SEQ ID NO:7)
P-Zm.Xet:1	6	1998	Промотор
I-Zm.Xet:1	7	191	Интрон
T-Zm.Xet:1	8	498	3' НТО
EXP-Zm.Sat6:1	9	2183	EXP: P-Zm.Sat6:1 (SEQ ID NO:10, I-Zm.Sat6:1 (SEQ ID NO:11)
P-Zm.Sat6:1	10	1998	Промотор
I-Zm.Sat6:1	11	178	Интрон
T-Zm.Sat6:1	12	498	3' НТО
EXP-Zm.GRMZM2G049726:1	13	2145	EXP: P-Zm.GRMZM2G049726:1 (SEQ ID NO:14), I-Zm.GRMZM2G049726:1 (SEQ ID NO:15)
P-Zm.GRMZM2G049726:1	14	1998	Промотор
I-Zm.GRMZM2G049726:1	15	140	Интрон
T-Zm.GRMZM2G049726:1	16	501	3' НТО
P-Zm.GRMZM2G141762:1	17	1998	Промотор + лидер
P-Zm.DSUL:1	18	1568	Промотор + лидер
P-Zm.GRMZM2G512113:1	19	2000	Промотор + лидер
T-Zm.GRMZM2G512113:1	20	704	3' НТО

[92] Идентифицированные EXP, промоторы/лидеры и 3' НТО были синтезированы и клонированы с использованием методов, известных в данной области техники, в бинарные векторные конструкции для трансформации растений в кассете экспрессии, используемой для управления экспрессией β-глюкуронидазы (GUS) для оценки их активности в стабильно трансформированных клетках растений кукурузы, как описано в примере 2 ниже.

10

## Пример 2

### Анализ регуляторных элементов, управляющих экспрессией GUS в стабильно трансформированных растениях кукурузы

[93] Растения кукурузы трансформировали вектором, в частности вектором экспрессии растений, содержащим тестируемые регуляторные элементы, управляющие экспрессией трангена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS, чтобы оценить влияние выбранного регуляторного элемента на экспрессию.

[94] Растения кукурузы трансформировали растительными конструкциями экспрессии GUS. Регуляторные элементы клонировали в базовый вектор экспрессии растения с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. Полученные векторы экспрессии растений содержали левую пограничную область из *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.левая граница), первую селекционную кассету трангена, используемую для селекции трансформированных растительных клеток, придающую устойчивость к гербициду глифосату, вторую кассету трангена для оценки активности регуляторных элементов, содержащую промотор и лидер, необязательно функционально связанные 5' с интроном в некоторых схемах векторов, функционально связанным с кодирующей последовательностью для GUS, содержащей процессуемый интрон (SEQ ID NO:21), функционально связанный с 3' НТО, и правую пограничную область из *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.правая граница).

[95] Конфигурации элементов экспрессии для экспрессионных кассет GUS для каждой конструкции представлены в таблице 2. Конструкт-1-конструкт-5 содержат экспрессионные кассеты GUS, содержащие функционально связанные нативный промотор и лидер (обозначенные как «P-») или функционально связанные нативный промотор, лидер и интрон (обозначенные как «EXP-»). Кассеты экспрессии GUS конструкт-1 и конструкт-2 не содержат интрона. Конструкт-1-конструкт-5 и конструкт-8 содержат нативную 3' НТО того же генетического локуса промотора/лидера или промотора/лидера/интрона. В конструкте-6 и конструкте-7 нативный промотор и лидер (обозначенные как «P-») были функционально связаны с экспрессируемым в растении интроном и 3' НТО, которые не были частью нативного гена. Конструкт-8 также содержит экспрессируемый в растениях интрон, который не был частью нативного гена.



**Таблица 2. Конфигурация экспрессионной кассеты GUS в конструктах 1-7.**

Конструкция	EXP или промотор/лидер	EXP или промотор/лидер, SEQ ID NO:	3' НТО	3' НТО, SEQ ID NO:
Конструкт-1	P-Zm.GRMZM2G487322:2 (без интрона)	1	T-Zm.GRMZM2G487322:2	2
Конструкт-2	P-Zm.GRMZM2G339781:1 (Без интрона)	3	T-Zm.GRMZM2G339781:1	4
Конструкт-3	EXP-Zm.Xet:1	5	T-Zm.Xet:1	8
Конструкт-4	EXP-Zm.Sat6:1	9	T-Zm.Sat6:1	12
Конструкт-5	EXP-Zm.GRMZM2G049726:1	13	T-Zm.GRMZM2G049726:1	16
Конструкт-6	P-Zm.GRMZM2G141762:1 + растительный интрон	17	Растительная 3' НТО	
Конструкт-7	P-Zm.DSUL:1 + растительный интрон	18	Растительная 3' НТО	
Конструкт-8	P-Zm.GRMZM2G512113:1 + растительный интрон	19	T-Zm.GRMZM2G512113:1	20

[96] Клетки растений кукурузы трансформировали с использованием бинарных векторных конструкций для трансформации, описанных выше, посредством *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, как это хорошо известно в данной области техники. Полученные трансформированные растительные клетки индуцировали для образования целых растений кукурузы.

[97] Качественный и количественный анализ GUS использовали для оценки активности элемента экспрессии в выбранных органах и тканях растения в трансформированных растениях. Для качественного анализа экспрессии GUS с помощью гистохимического окрашивания тотальные препараты или срезы тканей инкубировали с раствором для окрашивания GUS, содержащим 1 мг/мл X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-глюкуронид) в течение 5 ч. при 37°C и обесцвечивали 35% EtOH и 50% уксусной кислотой. Экспрессию GUS качественно определяли путем визуального осмотра отобранных органов или тканей растений на синюю окраску под стереомикроскопом или составным микроскопом.

[98] Для количественного анализа экспрессии GUS с помощью ферментативных анализов общий белок экстрагировали из выбранных тканей трансформированных растений кукурузы. От одного до двух микрограммов общего белка инкубировали с флуорогенным субстратом, 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-глюкуронидом (MUG) в концентрации 1 мМ в общем реакционном объеме 50 микролитров. После 1 ч. инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 350 мкл 200 мМ раствора

- бикарбоната натрия. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4- MU), максимально флуоресцентный при высоких значениях pH, когда гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует pH для количественного определения флуоресцентного продукта 4-MU. Количество образовавшегося 4-MU оценивали путем измерения его флуоресценции с использованием устройства для считывания микропланшетов FLUOstar Omega (BMG LABTECH) (возбуждение при 355 нм, выпуск при 460 нм). Значения активности GUS представлены в нмолях 4- MU /час/мг общего белка.
- 5 [99] Образцы следующих тканей брали для экспрессии GUS в поколении R<sub>0</sub>: лист и корень стадии V4; лист и корень стадии V7; лист, цветок/пыльник и пыльца стадии VT, початок/столбики стадии R1; и зародыш семени и эндосперм семени стадии R3 через 21 день после опыления (DAP).
- 10 [100] В таблицах 3 и 4 показана средняя количественная экспрессия GUS для образцов тканей, где «нуо» указывает на уровень ниже уровня обнаружения, а «НД» указывает на отсутствие анализа. Диапазоны экспрессии GUS для цветка/пыльника и пыльцы на стадии VT и початка/столбика стадии R1 также представлены в таблице 4.
- 15

20 **Таблица 3. Средняя экспрессия GUS стабильно трансформированных растений кукурузы для листьев и корней стадии V4; лист и корень стадии V7; лист стадии VT; и 21 DAP эмбрион и эндосперм.**

Конструкция	V4 корень	V4 лист	V7 корень	V7 лист	VT лист	21 DAP эмбрион	21 DAP эндосперм
Конструкт-1	23	25	30	24	24	40	22
Конструкт-2	39	37	39	40	22	49	37
Конструкт-3	22	27	75	59	нуо	НД	НД
Конструкт-4	36	40	37	36	22	48	41
Конструкт-5	22	30	27	28	25	28	23
Конструкт-6	103	62	39	53	42	329	332
Конструкт-7	70	49	48	35	42	41	50
Конструкт-8	46	нуо	25	нуо	нуо	20	71

**Таблица 4. Среднее значение GUS и диапазон экспрессии стабильно трансформированных растений кукурузы для VT цветков/пыльников и пыльцы и R1 початка/столбик.**

Конструкция	VT цветок, пыльники	VT цветок, пыльца	R1 початок, столбик	VT цветок, диапазон пыльников	VT цветок, диапазон пыльцы	R1 початок, диапазон столбиков
Конструкт-1	433	1202	23	27-2731	189 - 3998	23-24
Конструкт-2	434	1040	нуо	21-1228	47 - 1965	нуо
Конструкт-3	60	274	29	27-114	53 - 606	21-39
Конструкт-4	27	110	нуо	21-39	77 - 139	нуо
Конструкт-5	25	91	23	21-28	44 - 241	44-241
Конструкт-6	1182	НД	НД	634-1897	НД	НД
Конструкт-7	987	НД	1265	509-1279	НД	568-2151
Конструкт-8	63	НД	нуо	31-114	НД	нуо

5 [101] Как можно видеть в таблицах 3 и 4, многие экспрессионные кассеты GUS в каждой из конструкций демонстрировали более высокую экспрессию в VT цветках/пыльниках и/или пыльце, за исключением конструкции-6 и конструкции-7. Что касается конструкта-6, высокая экспрессия была количественно измерена в VT пыльнике и 21 DAP эмбрионе и эндосперме. Для конструкта-7 высокая экспрессия GUS  
10 была количественно измерена в VT пыльнике и R1 початке/столбике. Для конструкта-8 экспрессия VT пыльника была ниже по сравнению с конструктом-6 и конструктом-7. Экспрессия GUS в VT пыльце количественно не определялась для конструкта-6, конструкта-7 и конструкта-8. Конструкт-1 и конструкт-2 продемонстрировали высокую экспрессию GUS в VT пыльце с более высокой экспрессией GUS в VT  
15 цветке/пыльнике, чем в других тканях.

[102] Выбранные ткани из трансформированных объектов также рассматривали под микроскопом для определения аспекта качественной экспрессии, наблюдаемой при окрашивании тканей GUS. В таблице 5 ниже приведены наблюдения, сделанные для этих тканей.

20 **Таблица 5. Качественная экспрессия GUS стабильно трансформированных растений кукурузы.**

Конструкция	Качественная экспрессия GUS
Конструкт-1	Окрашивание пыльника связано с пыльцой.
Конструкт-2	Окрашивание пыльника связано с пыльцой.
Конструкт-3	Окрашивание пыльника связано с пыльцой.
Конструкт-4	Окрашивание пыльника связано с пыльцой.
Конструкт-5	Окрашивание пыльника связано с пыльцой.

Конструкция	Качественная экспрессия GUS
Конструкт-6	Видимое окрашивание VT пыльцы, чешуи/палеи и цветоножки; V7 мезофилла листа, оболочки пучка, сосудистого пучка и замыкающих клеток; V7 коры корня, эндодермы, эпидермиса и перицикла.
Конструкт-7	Видимое окрашивание VT пыльцы, чешуи/палеи и цветоножки; R1 столбика; V7 мезофилла листа, оболочки пучка, сосудистого пучка и замыкающих клеток; V7 коры корня, эндодермы, эпидермиса и перицикла.
Конструкт-8	Видимое окрашивание VT пыльцы; V4 кончика корня; R3 базального слоя клеток переноса эндосперма, алейрона, зародыша, эндосперма, цветоножки, околоплодника и щитка.

[103] Как видно из Таблицы 5, GUS-экспрессия в конструктах 1-5 в основном наблюдалась в VT пыльце и, таким образом, обеспечивала более высокую экспрессию в VT цветке/пыльнике при количественном измерении. Таким образом, элементы экспрессии в экспрессионных кассетах GUS конструктах 1-5 являются «предпочитаемыми в пыльце» элементами экспрессии. Что касается экспрессии GUS в конструктах 6-7, экспрессия GUS наблюдалась не только в VT пыльце, но и в других тканях, таких как клетки V7 листьев и корней. Интересно, что экспрессия GUS в конструкте-7 также наблюдалась в R1 столбике. Для конструкта-8 в VT пыльце было четко видно окрашивание пыльцы, а также окрашивание V4 кончика корня и R3 тканей зародыша 21DAP и эндосперма.

[104] Таким образом, элементы экспрессии, содержащиеся в экспрессионных кассетах GUS от конструктов 1-5, демонстрируют предпочтительный для пыльцы паттерн экспрессии. Экспрессионные элементы, содержащиеся в экспрессионных кассетах GUS конструкта-6, конструкта-7 и конструкта-8, хотя и демонстрируют экспрессию в пыльце, также экспрессируются в других тканях стабильно трансформированных растений кукурузы.

[105] Проиллюстрировав и описав основные идеи настоящего изобретения, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что изобретение может быть изменено по схеме и деталям без отклонения от этих основных идей. Заявляются все модификации, которые находятся в рамках сущности и объема формулы изобретения. Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в данном документе, настоящим включены в качестве ссылки в той же степени, как если

бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения в качестве ссылки.

## УТОЧНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из:
- 5           а) последовательности, имеющей по меньшей мере 85 процентов идентичности с последовательностью SEQ ID NO:2;
- b) последовательности, включающей SEQ ID NO:2; и
- c) фрагмента SEQ ID NO:2, причем фрагмент обладает ген-регуляторной активностью;
- 10           при этом указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.
2. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, в которой указанная последовательность имеет по меньшей мере 90 процентов идентичности
- 15           последовательности с последовательностью ДНК SEQ ID NO:2.
3. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, в которой указанная последовательность имеет по меньшей мере 95 процентов идентичности
- последовательности с последовательностью ДНК SEQ ID NO:2.
- 20
4. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, в которой последовательность ДНК обладает ген-регуляторной активностью.
5. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, в которой гетерологичная
- 25           транскрибируемая молекула ДНК содержит ген, представляющий агрономический интерес.
6. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 5, в которой ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к гербицидам.
- 30
7. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 5, в которой ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к вредителям.

8. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, в которой гетерологичная транскрибируемая молекула ДНК кодирует дцРНК, микроРНК или миРНК.
9. Клетка трансгенного растения, содержащая молекулу рекомбинантной ДНК,  
5 содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- а) последовательности, имеющей по меньшей мере 85 процентов идентичности с последовательностью SEQ ID NO:2;
  - б) последовательности, включающей SEQ ID NO:2; и
  - 10 в) фрагмента SEQ ID NO:2, причем фрагмент обладает ген-регуляторной активностью;
- при этом указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.
10. Клетка трансгенного растения по п. 9, причем указанная клетка трансгенного  
15 растения представляет собой клетку однодольного растения.
11. Клетка трансгенного растения по п. 9, причем указанная клетка трансгенного растения представляет собой клетку двудольного растения.
- 20 12. Трансгенное растение или его часть, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК по п. 1.
13. Растение-потомок трансгенного растения по п. 12 или его часть, причем растение-потомок или его часть содержит указанную молекулу рекомбинантной ДНК.  
25
14. Трансгенное семя, причем семя содержит молекулу рекомбинантной ДНК по п. 1.
15. Способ производства товарного продукта, включающий получение трансгенного  
30 растения или его части по п. 12 и получение из него товарного продукта.
16. Способ по п. 15, в котором товарный продукт, выбран из группы, состоящей из семян, обработанных семян, белкового концентрата, белкового изолята, крахмала,

зерна, части растений, масла из семян, биомассы, муки мелкого помола и муки грубого помола.

17. Способ экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК, включающий получение  
5 трансгенного растения по п. 12 и культивирование указанного растения, в котором экспрессируется транскрибируемая ДНК.



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MONS:479WO		<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2021/013244	International filing date (day/month/year) 13 January 2021	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 04 February 2020	
Applicant MONSANTO TECHNOLOGY LLC			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed.

a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_

as suggested by the applicant.

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b.  none of the figures is to be published with the abstract.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/013244

**Box No. 1** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
  - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- SEQ ID NOs:1-20 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/013244

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 15/113; C12N 15/82 (2021.01)

CPC - C12N 15/8218; C12N 15/8274; C12N 15/8279; C12N 2310/141 (2021.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0174258 A1 (NARVA et al) 05 July 2012 (05.07.2012) entire document	1-17
Y	US 2006/0141495 A1 (WU) 29 June 2006 (29.06.2006) entire document	1-17
A	US 2010/0223293 A1 (BUTRUILLE et al) 02 September 2010 (02.09.2010) entire document	1-17
A	US 2015/0240253 A1 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 27 August 2015 (27.08.2015) entire document	1-17
A	WO 2018/064516 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 05 April 2018 (05.04.2018) entire document	1-17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 April 2021

Date of mailing of the international search report

MAY 07 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300