

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
18 января 2024 (18.01.2024)



(10) Номер международной публикации
WO 2024/014976 A1

(51) Международная патентная классификация:

A01H 1/06 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01) C12N 15/05 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2022/000224

(22) Дата международной подачи:
13 июля 2022 (13.07.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

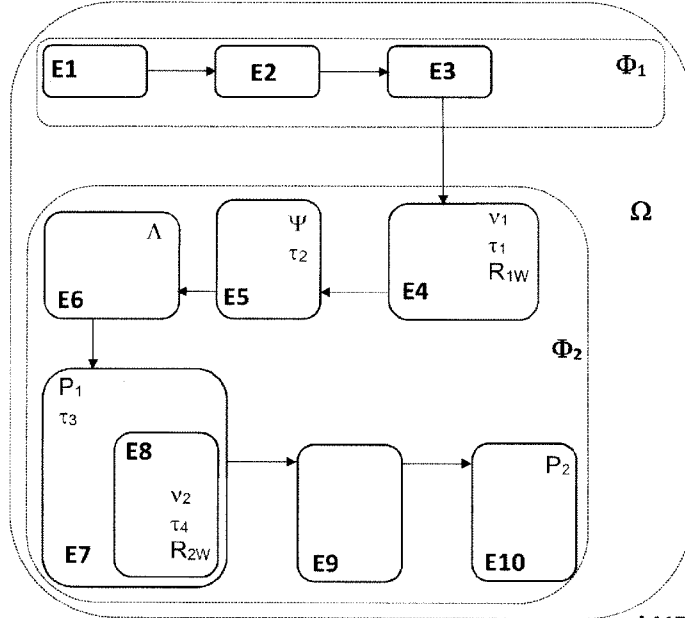
(71) Заявитель: ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА, ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,

ФГАНУ (INSTITUTE FOR POLIOMYELITIS, CHUMAKOV FEDERAL SCIENTIFIC CENTER FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT OF IMMUNE-AND-BIOLOGICAL PRODUCTS OF RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES, FSAS) [RU/RU]; посёлок Института полиомиелита, 8, корп. 1 Москва, поселение Московский, 108819, Moscow, Moskovsky settlement (RU).

(72) Изобретатели: **МАРТИРОСЯН, Юрий Цатурович (MARTIROSYAN, Iurii Tsaturovich)**; ул. Садовая, дом 86 Московская область, Ленинский район, посёлок Горки Ленинские, 142712, Moscow region, Leninskii district, poselok Gorki Leninskie (RU). **МАРТИРОСЯН, Левон Юрьевич (MARTIROSYAN, Levon Yurievich)**; ул. Садовая, дом 86 Московская область, Ленинский район, посёлок Горки Ленинские, 142712, Moscow region,

(54) Title: INFILTRATING TARGET COMPONENTS INTO THE TISSUES OF A VEGETATING PLANT

(54) Название изобретения: ИНФИЛЬТРАЦИЯ ЦЕЛЕВЫХ КОМПОНЕНТОВ В ТКАНИ ВЕГЕТИРУЮЩЕГО РАСТЕНИЯ



ФИГ. 1

(57) Abstract: The group of inventions relates to the fields of biotechnology, plant cultivation, pharmacognosy and biochemistry, and more particularly to a device and method for delivering target components to the intercellular space of plant tissues and to cells for the transient expression of target genes and the production of pharmaceutically valuable protein products. The claimed method includes filling a container with an aqueous medium, immersing a vegetating plant into the aqueous medium, hermetically sealing the container, subjecting the vegetating plant to a primary ultrasonic treatment, creating a vacuum inside the container, releasing the vacuum with the aid of a pressure regulator, and subjecting the container to a first pressurization. The inventions provide enhanced infiltration of any part of the tissue of a vegetating plant immersed in the aqueous medium inside the container.



WO 2024/014976 A1

Leninskii district, poselok Gorki Leninskii (RU). **МАРТИРОСЯН, Давид Юрьевич (MARTIROSYAN, David Yurievich)**; ул. Новое шоссе, дом 94, кв. 9 Московская область, Ленинский район, посёлок Горки Ленинские, 142712, Moscow region, Leninskii district, poselok Gorki Leninskii (RU). **АКОПЯН, Валентин Бабкенович (AKOPYAN, Valentin Babkenovich)**; ул. Русаковская, дом 25, кв. 147 Москва, 107113, Moscow (RU). **ЦВЕТКОВ, Василий Владимирович (TSVETKOV, Vasily Vladimirovich)**; дом 4, кв. 243 Москва, поселение Филимонковское, посёлок Марьино, 108815, Moscow, settlement Filimonkovskoe, poselok Maryino (RU). **ИВИН, Юрий Юрьевич (IVIN, Yury Yurievich)**; ул. Менделеева, дом 86 Челябинская область, Троицк, 457103, Chelyabinskaya region, Troitsk (RU). **СЛАВОХОТОВА, Анна Александровна (SLAVOKHOTOVA, Anna Aleksandrovna)**; ул. Южнобутовская, дом 101, кв. 18 Москва, 117042, Moscow (RU). **ПИНЯЕВА, Анастасия Николаевна (PINIAEVA, Anastasiia Nikolaevna)**; 3 микрорайон, дом 3, кв. 71 Москва, поселение Московский, 108819, Moscow, Moskovsky settlement (RU). **ИШМУХАМЕТОВ, Айдар Айратович (ISHMUKHAMETOV, Aydar Ayratovich)**; 4-й Самотечный переулок, дом 3, кв. 134 Москва, 127473, Moscow (RU). **СИНЮГИНА, Александра Александровна (SINYUGINA, Aleksandra Aleksandrovna)**; дом 4, кв. 125 Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, 108819, Moscow, Moskovsky settlement, poselok Instituta Poliomyelita (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (ii))
- об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

(57) Реферат: Группа изобретений относится к области биотехнологии, растениеводства, фармакогнозии, биохимии, а именно к способу и устройству доставки целевых компонентов в межклеточное пространство растительных тканей и в клетки для транзientной экспрессии целевых генов и получения фармацевтически ценных белковых продуктов. Осуществляют запол-

нение контейнера водной средой, погружение вегетирующего растения в эту водную среду, герметизацию контейнера, первичное ультразвуковое воздействие на вегетирующее растение, вакуумирование контейнера, сброс вакуума в контейнере с помощью регулятора давления, первую опрессовку контейнера. Изобретения обеспечивают усиление инфильтрации любой части тканей вегетирующего растения, погруженного в водную среду внутри контейнера.

ИНФИЛЬТРАЦИЯ ЦЕЛЕВЫХ КОМПОНЕНТОВ В ТКАНИ ВЕГЕТИРУЮЩЕГО РАСТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, растениеводства, фармакогнозии, биохимии и, в частности, к способу доставки (преимущественно, с помощью инфильтрации) целевых компонентов (например, вирусных частиц, и/или макромолекул нуклеиновых кислот, и/или нуклеопротеиновых комплексов) в межклеточное пространство растительных тканей и в клетки, для транзientной экспрессии целевых генов и получения фармацевтически ценных белковых продуктов.

Инфильтрация заключается во введении в листья и/или другие части живого растения, различных веществ (целевых компонентов). С помощью этой технологии возможно получить трансгенные растения путем их трансформации *in planta*, с возможностью последующего перепрограммирования растительных клеток и/или редактирования их генома. В частности, инфильтрация может быть использована для замены клеток млекопитающих и птиц клетками и тканями растений при производстве вакцин и терапевтических белков для медицинских и ветеринарных целей, как это описано, например, в [1].

Согласно первой из своих сторон, изобретение относится к способу для инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения, содержащего подготовительную фазу, включающую в себя следующие этапы:

- этап заполнения контейнера водной средой, содержащей эти целевые компоненты,
- этап погружения predetermined части тканей вегетирующего растения в водную среду внутри контейнера,
- этап герметизации контейнера.

Данный способ инфильтрации известен и характеризуется низкой эффективностью внедрения целевых компонентов внутрь межклеточных пространств живых растительных клеток и, в целом, длительным циклом трансформации тканей вегетирующего растения, что неоптимально.

5 Опирающееся на это оригинальное наблюдение настоящее изобретение главным образом имеет целью предложить способ инфильтрации, позволяющий, по меньшей мере, сгладить, как минимум, один из указанных выше недостатков. Для достижения этой цели способ инфильтрации, соответствующий приведенному во вступлении выше
10 общему описанию, характеризуется по существу тем, что он дополнительно содержит фазу обработки тканей вегетирующего растения, которая следует за подготовительной фазой и включает в себя следующие этапы:

- этап первичного ультразвукового воздействия на эту
15 предопределённую часть тканей вегетирующего растения с помощью излучателя, расположенного внутри контейнера и погруженного в водную среду, при этом первая частота работы излучателя, первая длительность работы излучателя и первая плотность мощности работающего излучателя в водной среде выбраны таким образом, чтобы обеспечить
20 превышение порога кавитации этой водной среды,
- этап вакуумирования контейнера с помощью источника разрежения, соединённого с контейнером, при этом разрежение, создаваемое внутри контейнера источником разрежения, и вторая длительность поддержания разрежения, созданного внутри контейнера,
25 выбраны таким образом, чтобы обеспечить удаление остатков пузырьков воздуха из межклеточных пространств тканей вегетирующего растения,
- этап регулируемого сброса вакуума в контейнере с помощью первого регулятора давления, взаимодействующего с контейнером, при этом скорость открывания первого регулятора давления такова, чтобы
30 исключить вскипание водной среды,

- этап первой опрессовки контейнера с помощью компрессора, соединённого с контейнером, при этом первое избыточное давление, создаваемое внутри контейнера компрессором, и третья длительность поддержания, созданного внутри контейнера первого избыточного давления выбраны таким образом, чтобы обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения.

Тот факт, что фаза обработки содержит четыре указанных этапа (ультразвуковое воздействие, вакуумирование, регулируемый сброс вакуума, опрессовка) позволяет создать синергетическое воздействие на ткани вегетирующего растения, что позволяет целевым компонентам быстрее и легче проникать в межклеточное пространство растительных тканей. В результате, при прочих равных условиях, количество целевых компонентов, введённых в межклеточное пространство растительных тканей в единицу времени, растёт. Таким образом, описанное выше синергетическое воздействие усиливает инфильтрацию и повышает её эффективность.

Кроме того, это синергетическое воздействие позволяет одинаково эффективно проводить инфильтрацию для любого типа predetermined части тканей вегетирующего растения, погружённой в водную среду внутри контейнера и, в частности, в такие плотные части, как корень и стебель.

Преимущественно, фаза обработки тканей вегетирующего растения дополнительно содержит этап вторичного ультразвукового воздействия на эту predetermined часть тканей вегетирующего растения с помощью излучателя, расположенного внутри контейнера и погруженного в водную среду. В этих условиях этап вторичного ультразвукового воздействия происходит одновременно с этапом опрессовки контейнера. Вторая частота работы излучателя, четвёртая длительность работы излучателя и вторая плотность мощности работающего излучателя в водной среде выбраны таким образом, чтобы

обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения.

Благодаря этим выгодным признакам, расширяется разнообразие возможностей, обеспечивающее оптимальный выбор путей инфильтрации целевых компонентов в растительную ткань.

Преимущественно, после этапа первой опрессовки, фаза обработки тканей вегетирующего растения дополнительно содержит этап полного сброса первого избыточного давления с помощью второго регулятора давления, взаимодействующего с контейнером.

Эти выгодные признаки увеличивают функциональные возможности способа инфильтрации, согласно изобретению, и, в частности, вносит вклад в увеличение его надежности: например, в случае поломки (то есть выхода из строя) первого регулятора давления.

Преимущественно, после этапа полного сброса первого избыточного давления, фаза обработки тканей вегетирующего растения дополнительно содержит этап второй опрессовки контейнера с помощью компрессора, при этом второе избыточное давление содержится в пределах от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $2,0 \cdot 10^5$ Па.

Вторая опрессовка контейнера дополнительно повышает эффективность инфильтрации для любого типа predetermined части тканей вегетирующего растения, погружённой в водную среду внутри контейнера и, в частности, в такие плотные части, как корень и стебель. Указанное выше значение второго избыточного давления позволяет эффективно проводить инфильтрацию целевых компонентов в ткани вегетирующего растения в течение длительного времени, например, от нескольких десятков минут до нескольких суток.

Согласно первому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота работы излучателя содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
 - первая длительность работы излучателя содержится в интервале от 10 с до 300 с, и
- 5
- первая плотность мощности работающего излучателя в водной среде содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика трех указанных признаков способа (частоты, длительности, плотности мощности), при которых ультразвуковое воздействие

10 обеспечивает превышение порога кавитации в водной среде. Наличие в водной среде схлопывающихся кавитационных пузырьков воздуха способствует кавитационной эрозии поверхности вегетирующего растения. Кроме того, первая длительность работы излучателя, содержащаяся в (широком) интервале от 10 с до 300 с способствует

15 расширению функциональных возможностей способа инфильтрации, согласно изобретению, в части эффективной ультразвуковой дегазации межклеточных пространств для любого типа predetermined части тканей вегетирующего растения, погруженной в водную среду внутри контейнера и, особенно, для эффективной ультразвуковой дегазации

20 межклеточных пространств такой плотной predetermined части вегетирующего растения, как его корень и/или стебель.

Согласно второму варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа первичного ультразвукового воздействия:

- 25
- первая частота работы излучателя содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
 - первая длительность работы излучателя содержится в интервале от 90 с до 120 с, и

- первая плотность мощности работающего излучателя в водной среде содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика трех указанных признаков способа (частоты, длительности, 5 плотности мощности), при которых ультразвуковое воздействие обеспечивает превышение порога кавитации в водной среде. Наличие в водной среде схлопывающихся кавитационных пузырьков воздуха способствует кавитационной эрозии поверхности вегетирующего растения. Кроме того, в отличие от первого варианта реализации способа 10 инфильтрации, описанного выше, данный второй вариант реализации является первой длительностью работы излучателя, которая содержится в укороченном интервале от 10 с до 120 с. Это ограничивает (с 300 с до 120 с, при прочих равных условиях) максимальное время первичного ультразвукового воздействия, что способствует более щадящей (для 15 структурной целостности тканей вегетирующего растения, особенно для его семян) ультразвуковой дегазации межклеточных пространств.

Согласно третьему варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота работы излучателя составляет 32 кГц,
- первая длительность работы излучателя содержится в интервале от 30 с до 60 с, и
- первая плотность мощности работающего излучателя в водной среде содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика трех указанных признаков способа (частоты, длительности, 25 плотности мощности), при которых ультразвуковое воздействие обеспечивает превышение порога кавитации в водной среде. Наличие в водной среде схлопывающихся кавитационных пузырьков воздуха 30 способствует кавитационной эрозии поверхности вегетирующего

растения. Кроме того, в отличие от первого и второго вариантов реализации способа инфильтрации, описанных выше, данный третий вариант реализации являет первую длительность работы излучателя, которая содержится в узком интервале от 30 с до 60 с. Это позволяет, с одной стороны, разумно уменьшить до 60 с максимальное время первичного ультразвукового воздействия, что способствует более щадящей (для структурной целостности тканей вегетирующего растения, особенно для его листьев и/или клубней) ультразвуковой дегазации межклеточных пространств. С другой стороны, выбор данного узкого интервала позволяет увеличить с 10 с до 30 с минимальное время первичного ультразвукового воздействия, что гарантирует (при прочих равных условиях) достаточную для целей инфильтрации ультразвуковую дегазацию межклеточных пространств в тканях вегетирующего растения. В этих условиях, согласно наблюдениям заявителя, именно выбор первой частоты работы излучателя равной 32 кГц позволяет обеспечить максимально возможную синергетику трех указанных признаков способа (частоты, длительности, плотности мощности) для широкого списка вегетирующих растений (в частности, для табака), при которой ультразвуковая дегазацию межклеточных пространств тканей особенно заметна.

Согласно четвёртому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа вакуумирования контейнера:

- разрежение, создаваемое внутри контейнера источником разрежения, содержится в интервале от $0,1 \cdot 10^5$ Па до $0,7 \cdot 10^5$ Па, и
- вторая длительность поддержания разрежения, созданного внутри контейнера, содержится в интервале от 60 с до 300 с.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика двух указанных признаков способа (собственно разрежения и длительности его поддержания внутри контейнера). Благодаря такой

синергетике, происходит эффективное удаление остатков пузырьков воздуха из межклеточных пространств тканей вегетирующего растения. Кроме того, вторая длительность поддержания созданного внутри контейнера разрежения, содержащаяся в (широком) интервале от 60 с до 5 300 с способствует расширению функциональных возможностей способа инфильтрации, согласно изобретению, в части эффективного удаления остатков пузырьков воздуха в межклеточных пространствах тканей вегетирующего растения, погружённого в водную среду внутри контейнера и, особенно, для эффективного удаления остатков пузырьков 10 воздуха в межклеточных пространствах такой плотной predetermined части вегетирующего растения, как его корень и/или стебель.

Согласно пятому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа вакуумирования контейнера:

- 15 • разрежение, создаваемое внутри контейнера источником разрежения, содержится в интервале от $0,1 \cdot 10^5$ Па до $0,7 \cdot 10^5$ Па, и
- вторая длительность поддержания разрежения, созданного внутри контейнера, содержится в интервале от 90 с до 300 с.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается 20 синергетика двух указанных признаков способа (собственно разрежения и длительности его поддержания внутри контейнера). Благодаря такой синергетике, происходит эффективное удаление остатков пузырьков воздуха из межклеточных пространств тканей вегетирующего растения. Кроме того, выбор данного узкого интервала от 90 с до 300 с для второй 25 длительности поддержания созданного внутри контейнера разрежения позволяет увеличить с 60 с до 90 с минимальное время воздействия разрежением на ткани вегетирующего растения с целью эффективного удаления остатков пузырьков воздуха из их межклеточных пространств. Согласно наблюдениям заявителя, именно выбор данного узкого 30 интервала от 90 с до 300 с для второй длительности поддержания

созданного внутри контейнера разрежения наряду с разрежением от $0,1 \cdot 10^5 \text{Па}$ до $0,7 \cdot 10^5 \text{Па}$ позволяет обеспечить максимально возможную синергетику этих двух указанных признаков способа для широкого списка вегетирующих растений (в частности, для табака), при которой
5 остаточная дегазация межклеточных пространств их тканей особенно заметна.

Согласно шестому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа первой опрессовки контейнера:

- первое избыточное давление, создаваемое компрессором внутри
10 контейнера, содержится в интервале от $1,5 \cdot 10^5 \text{Па}$ до $10 \cdot 10^5 \text{Па}$, и
- третья длительность поддержания первого избыточного давления, созданного внутри контейнера, содержится в интервале от 60 с до 300с.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается
15 синергетика двух указанных признаков способа (собственно избыточное давление и длительности его поддержания внутри контейнера). Благодаря такой синергетике, происходит эффективное снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения. Кроме
20 того, третья длительность поддержания первого избыточного давления, созданного внутри контейнера, содержащаяся в (широком) интервале от 60 с до 300 с, способствует расширению функциональных возможностей способа инфильтрации, согласно изобретению, в части снижения
диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в
25 межклеточные пространства тканей вегетирующего растения, погружённого в водную среду внутри контейнера и, особенно, для такой плотной predetermined части вегетирующего растения, как его корень и/или стебель.

Согласно седьмому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа первой опрессовки контейнера:

- первое избыточное давление, создаваемое компрессором внутри контейнера, содержится в интервале от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $10 \cdot 10^5$ Па, и
- третья длительность поддержания первого избыточного давления, созданного внутри контейнера, содержится в интервале от 90 с до 300 с.

Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика двух указанных признаков способа (собственно избыточного давления и длительности его поддержания внутри контейнера). Благодаря такой синергетике, происходит эффективное снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения. Кроме того, выбор данного узкого интервала от 90 с до 300 с для третьей длительности поддержания первого избыточного давления, созданного внутри контейнера, позволяет увеличить с 60 с до 90 с минимальное время воздействия избыточным давлением на ткани вегетирующего растения с целью эффективного снижения диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения. Согласно наблюдениям заявителя, именно выбор данного узкого интервала от 90 с до 300 с для третьей длительности поддержания созданного внутри контейнера первого избыточного давления наряду с первым избыточным давлением от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $10 \cdot 10^5$ Па позволяет обеспечить максимально возможную синергетику этих двух указанных признаков способа для широкого списка вегетирующих растений (в частности, для табака), при которой снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в межклеточные пространства особенно заметно.

Согласно восьмому варианту реализации способа инфильтрации, согласно изобретению, во время этапа вторичного ультразвукового воздействия:

- 5 • вторая частота работы излучателя содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
- четвёртая длительность работы излучателя содержится в интервале от 10 с до 300 с, и
- вторая плотность мощности работающего излучателя в водной среде содержится в интервале от 0,5 Вт·см⁻³ до 1,5 Вт·см⁻³.

10 Благодаря этим выгодным признакам, обеспечивается синергетика трёх указанных признаков способа (собственно частота работы излучателя, длительности его работы и плотность его мощности). Благодаря такой синергетике, происходит эффективное снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов в
15 межклеточные пространства тканей вегетирующего растения. Кроме того, выбор данного узкого интервала от 10 с до 300 с для четвёртой длительности работы излучателя позволяет оптимизировать время воздействия излучения на ткани вегетирующего растения с целью эффективного снижения диффузионных ограничений при введении
20 целевых компонентов в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения. Согласно наблюдениям заявителя, именно выбор данного узкого интервала от 10 с до 300 с для четвёртой длительности работы излучателя наряду со второй плотностью мощности работающего излучателя в водной среде от 0,5 Вт·см⁻³ до
25 1,5 Вт·см⁻³ позволяет обеспечить максимально возможную синергетику этих трёх указанных признаков способа для широкого списка вегетирующих растений (в частности, для табака, например, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca* и другие), при которой снижение диффузионных ограничений при введении целевых
30 компонентов в межклеточные пространства особенно заметно.

Преимущественно, predetermined частью вегетирующего растения, которая погружается в водную среду внутри контейнера, является всё целое вегетирующее растение, включающее в себя листья, стебли, корни, клубни, семена.

5 Это позволяет подвергать воздействию данного способа всё растение целиком, что повышает выход конечного продукта. Кроме того, возможность подвергать воздействию данного способа именно корневую систему вегетирующего растения открывает новые возможности для получения специфических продуктов, который невозможно или
10 неоптимально получать, воздействуя на листья и/или на стебли.

Преимущественно, водная среда внутри контейнера содержит водную суспензию по меньшей мере одного из следующих целевых компонентов: (а) бактерий; (б) вирусов; (в) генетического материала, содержащего целевые гены; (г) генетического материала, содержащего
15 гены белка оболочки вирусов; (д) вирусных частиц; (е) макромолекул нуклеиновых кислот; (ж) белков; (з) нуклеопротеиновых комплексов; (и) органических соединений; (к) неорганических соединений; (л) вирусоподобных частиц.

Благодаря этим выгодным признакам, способ инфильтрации,
20 согласно изобретению, адаптирован к широкой гамме целевых компонентов и множеству применений.

Согласно второй из своих сторон, изобретение относится к устройству для инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения. Это устройство содержит:

- 25
- контейнер, адаптированный для герметизации,
 - излучатель, расположенный внутри контейнера и адаптированный для излучения ультразвуковых волн, при этом этот излучатель также соединён с ультразвуковым генератором,
 - источник разрежения, соединённый с контейнером,

- первый регулятор давления, соединённый с контейнером,
- компрессор, соединённый с контейнером,
- второй регулятор давления, соединённый с контейнером,
- блок управления, селективно взаимодействующий с источником разрежения, первым регулятором давления, компрессором, вторым регулятором давления, ультразвуковым генератором,

при этом устройство адаптировано для осуществления способа инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения, согласно изобретению.

- 10 Благодаря такому устройству, возможно поставить на поток инфильтрацию целевых компонентов в ткани вегетирующих растений для массовых биотехнологических производств.

- 15 Преимущественно, устройство для инфильтрации дополнительно содержит держатель для селективной фиксации вегетирующего растения внутри контейнера.

Благодаря этому выгодному признаку, возможно оптимизировать укладку растений внутри контейнера, и тем самым повысить производительность устройства, то есть массу вегетирующих растений, подвергающихся инфильтрации в единицу времени.

- 20 Преимущественно, источник разрежения и компрессор объединены друг с другом.

Благодаря этому выгодному признаку, возможно ускорить производство установки для реализации способа, снизить её вес и объем.

- 25 Преимущественно, первый регулятор давления и второй регулятор давления объединены друг с другом.

Благодаря этому выгодному признаку, возможно ускорить производство установки для реализации способа, снизить её вес и объем.

Преимущественно, устройство для инфильтрации адаптировано
5 для получения вирусоподобных частиц.

Вирусоподобные частицы (по-английски «virus-like particles»), — это молекулярные комплексы, похожие на вирусы, но не способные к инфицированию живых организмов, поскольку не содержат вирусного генома. Тот факт, что устройство для инфильтрации адаптировано для
10 получения вирусоподобных частиц позволяет ускорить производство вакцин.

Согласно третьей из своих сторон, изобретение относится к использованию устройства для инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения, согласно изобретению, с целью создания
15 вакцин.

Такое использование устройства позволяет ускорить производство вакцин.

Другие отличительные признаки и преимущества изобретения явно вытекают из описания, приведенного ниже для иллюстрации и не
20 являющегося ограничительным, со ссылками на прилагаемые рисунки, на которых:

- фигура 1 схематично изображает пример способа инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения, согласно изобретению,
- 25 • фигура 2 схематично изображает - на упрощённом виде сбоку в разрезе – пример устройства для инфильтрации целевых компонентов в ткани вегетирующего растения, согласно изобретению,
- фигура 3 представляет фотографию некоторых частей устройства для инфильтрации, согласно изобретению, схематично показанного на

фигуре 2, а именно: открытый (до герметизации) контейнер, внутри которого находится держатель сетчатого типа для селективной фиксации в нём вегетирующего растения,

- фигура 4 представляет фотографию некоторых частей устройства для инфильтрации, согласно изобретению, схематично показанного на 5 фигуре 2, а именно: держатель каркасного типа для селективной фиксации вегетирующего растения (внутри контейнера, последний не показан).

Как упомянуто ранее и представлено на фигурах 1-2, изобретение 10 относится, согласно первой из своих сторон, к способу Ω инфильтрации целевых компонентов Z в ткани вегетирующего растения 1.

Как показано на фиг. 1–2, этот способ Ω инфильтрации содержит подготовительную фазу Φ_1 , включающую в себя следующие этапы:

- этап E1 заполнения контейнера 20 водной средой M , содержащей эти 15 целевые компоненты Z ,
- этап E2 погружения predetermined части 10 тканей вегетирующего растения 1 в водную среду M внутри контейнера 20,
- этап E3 герметизации контейнера 20.

Под «предetermined частью 10» тканей вегетирующего 20 растения 1 надо понимать, например, «только листья 11 на стебле 12» (то есть, иными словами, «стеблевая зона с листьями»), или «только корни 13 (клубни 14)», или «только макушка растения 1 с семенами 15». Заявитель отмечает, что возможность подвергать инфильтрации именно корневую систему 13, 14 вегетирующего растения 1 открывает 25 возможности для получения специфических продуктов, который невозможно или неоптимально получать, воздействуя на листья 11 и/или на стебли 12. Например, для целей создания так называемых «съедобных вакцин» (то есть вакцин, которые адаптированы для перорального приёма) эффективно подвергать инфильтрации именно

миниклубни и столоны вегетирующего картофеля известного, как «*Solanum tuberosum*». Другим примером может служить процесс получения таких продуктов, как, например, бутирилхолинэстераза, пероксидаза хрена. Для их получения эффективно подвергать
5 инфильтрации именно открытую (ибо растущую в аэропонных условиях) корневую систему растения хрена известного, как «*Armoracia rusticana*».

В самом общем случае (не показан), predetermined частью
10 вегетирующего растения 1, которая погружается в водную среду М внутри контейнера 20, может быть всё вегетирующее растение 1 целиком, включающее в себя листья 11, стебли 12, корни 13, клубни 14, семена 15.

Согласно изобретению, как показано на фиг. 1–2, этот способ Ω инфильтрации дополнительно содержит фазу обработки Φ_2 тканей вегетирующего растения 1, которая следует за подготовительной фазой
15 Φ_1 и включает в себя следующие этапы:

- этап E4 первичного ультразвукового воздействия на эту predetermined часть 10 тканей вегетирующего растения 1 с помощью излучателя 21, расположенного внутри контейнера 20 и погруженного в водную среду М, при этом первая частота ν_1 работы
20 излучателя 21, первая длительность τ_1 работы излучателя 21 и первая плотность R_{1W} мощности W работающего излучателя 21 в водной среде М выбраны таким образом, чтобы обеспечить превышение порога кавитации этой водной среды М,
- этап E5 вакуумирования контейнера 20 с помощью источника 22 разрежения Ψ , соединённого с контейнером 20, при этом разрежение Ψ , создаваемое внутри контейнера 20 источником 22 разрежения Ψ , и
25 вторая длительность τ_2 поддержания разрежения Ψ , созданного внутри контейнера 20, выбраны таким образом, чтобы обеспечить удаление остатков пузырьков воздуха из межклеточных пространств
30 тканей вегетирующего растения 1,

- этап E6 регулируемого сброса вакуума в контейнере 20 с помощью первого регулятора 23 давления P , взаимодействующего с контейнером 20, при этом скорость открывания Λ первого регулятора 23 давления P такова, чтобы исключить вскипание водной среды M ,
- 5 • этап E7 первой опрессовки контейнера 20 с помощью компрессора 24, соединённого с контейнером 20, при этом первое избыточное давление P_1 , создаваемое внутри контейнера 20 компрессором 24, и третья длительность τ_3 поддержания созданного внутри контейнера 20 первого избыточного давления P_1 выбраны таким образом, чтобы
10 обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов Z в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения 1.

Преимущественно, фаза обработки Φ_2 тканей вегетирующего растения 1 дополнительно содержит этап E8 вторичного ультразвукового
15 воздействия на эту predetermined часть 10 тканей вегетирующего растения 1 с помощью излучателя 21, расположенного внутри контейнера 20 и погруженного в водную среду M . В этих условиях, этап E8 вторичного ультразвукового воздействия происходит одновременно с этапом E7 опрессовки контейнера 20. При этом, вторая частота ν_2 работы
20 излучателя 21, четвёртая длительность τ_4 работы излучателя 21 и вторая плотность R_{2W} мощности W работающего излучателя 21 в водной среде M выбраны таким образом, чтобы обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов Z в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения 1.

25 Как видно из фиг. 1, после этапа E7 первой опрессовки, фаза обработки Φ_2 тканей вегетирующего растения 1 может дополнительно содержать этап E9 полного сброса первого избыточного давления P_1 с помощью второго регулятора 25 давления P , взаимодействующего с контейнером 20.

Также, как видно из фиг. 1, после этапа E9 полного сброса первого избыточного давления P_1 , фаза обработки Φ_2 тканей вегетирующего растения 1 может дополнительно содержать этап E10 второй опрессовки контейнера 20 с помощью компрессора 24, при этом второе избыточное давление P_2 поддерживается в пределах от $1,5 \cdot 10^5 \text{Па}$ до $2 \cdot 10^5 \text{Па}$:
5 $1,5 \cdot 10^5 \text{Па} \leq P_2 \leq 2 \cdot 10^5 \text{Па}$.

Преимущественно, во время этапа E4 первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота ν_1 работы излучателя 21 лежит в диапазоне от 20 кГц до 48 кГц: $20 \text{ кГц} \leq \nu_1 \leq 48 \text{ кГц}$,
10
- первая длительность τ_1 работы излучателя 21 лежит в пределах от 10 с до 300 с: $10 \text{ с} \leq \tau_1 \leq 300 \text{ с}$, и
- первая плотность R_{1W} мощности W работающего излучателя 21 в водной среде M лежит в пределах от $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$:
15 $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3} \leq R_{1W} \leq 10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

В одном из вариантов реализации способа Ω инфильтрации, во время этапа E4 первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота ν_1 работы излучателя 21 лежит в диапазоне от 20 кГц до 48 кГц: $20 \text{ кГц} \leq \nu_1 \leq 48 \text{ кГц}$,
- 20 • первая длительность τ_1 работы излучателя 21 лежит в пределах от 90 с до 120 с: $90 \text{ с} \leq \tau_1 \leq 120 \text{ с}$, и
- первая плотность R_{1W} мощности W работающего излучателя 21 в водной среде M лежит в пределах от $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$:
25 $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3} \leq R_{1W} \leq 10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

В другом варианте реализации способа Ω инфильтрации, во время этапа E4 первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота ν_1 работы излучателя 21 составляет 32 кГц,

- первая длительность τ_1 работы излучателя 21 лежит в пределах от 30 с до 60 с: $30 \text{ с} \leq \tau_1 \leq 60 \text{ с}$, и
- первая плотность R_{1W} мощности W работающего излучателя 21 в водной среде M лежит в пределах от $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$:
5 $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3} \leq R_{1W} \leq 10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$.

Преимущественно, во время этапа E5 вакуумирования контейнера 20:

- разрежение Ψ , создаваемое внутри контейнера 20 источником 22 разрежения Ψ , лежит в пределах от $0,1\cdot 10^5 \text{ Па}$ до $0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$:
10 $0,1\cdot 10^5 \text{ Па} \leq \Psi \leq 0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$, и
- вторая длительность τ_2 поддержания разрежения Ψ , созданного внутри контейнера 20, лежит в пределах от 60 с до 300 с:
 $60 \text{ с} \leq \tau_2 \leq 300 \text{ с}$.

В одном из вариантов реализации способа Ω инфильтрации, во
15 время этапа E5 вакуумирования контейнера 20:

- разрежение Ψ , создаваемое внутри контейнера 20 источником 22 разрежения Ψ , содержится в интервале от $0,1\cdot 10^5 \text{ Па}$ до $0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$:
 $0,1\cdot 10^5 \text{ Па} \leq \Psi \leq 0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$, и
- вторая длительность τ_2 поддержания разрежения Ψ , созданного
20 внутри контейнера 20, лежит в пределах от 90 с до 300 с:
 $90 \text{ с} \leq \tau_2 \leq 300 \text{ с}$.

Преимущественно, во время этапа E7 первой опрессовки контейнера 20:

- первое избыточное давление P_1 , создаваемое компрессором 24
25 внутри контейнера 20, лежит в пределах от $1,5\cdot 10^5 \text{ Па}$ до $10\cdot 10^5 \text{ Па}$:
 $1,5\cdot 10^5 \text{ Па} \leq P_1 \leq 10\cdot 10^5 \text{ Па}$, и

- третья длительность τ_3 поддержания первого избыточного давления P_1 , созданного внутри контейнера 20, лежит в пределах от 60 с до 300с: $60 \text{ с} \leq \tau_3 \leq 300 \text{ с}$.

В одном из вариантов реализации способа Ω инфильтрации, во время этапа E7 первой опрессовки контейнера 20:

- первое избыточное давление P_1 , создаваемое компрессором 24 внутри контейнера 20, лежит в пределах от $1,5 \cdot 10^5 \text{ Па}$ до $10 \cdot 10^5 \text{ Па}$: $1,5 \cdot 10^5 \text{ Па} \leq P_1 \leq 10 \cdot 10^5 \text{ Па}$, и
- третья длительность τ_3 поддержания первого избыточного давления P_1 , созданного внутри контейнера 20, лежит в пределах от 90 с до 300с: $90 \text{ с} \leq \tau_3 \leq 300 \text{ с}$.

Преимущественно, во время этапа E8 вторичного ультразвукового воздействия:

- вторая частота ν_2 работы излучателя 21 лежит в интервале от 20кГц до 48кГц: $20 \text{ кГц} \leq \nu_2 \leq 48 \text{ кГц}$,
- четвёртая длительность τ_4 работы излучателя 21 лежит в пределах от 10 с до 300 с: $10 \text{ с} \leq \tau_4 \leq 300 \text{ с}$, и
- вторая плотность R_{2W} мощности W работающего излучателя в водной среде M лежит в пределах от $0,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$: $0,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3} \leq R_{2W} \leq 1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

Преимущественно, водная среда M внутри контейнера 20 содержит водную суспензию по меньшей мере одного из следующих целевых компонентов Z : (а) бактерий (в том числе, агробактерий); (б) вирусов; (в) генетического материала, содержащего целевые гены; (г) генетического материала, содержащего гены белка оболочки вирусов; (д) вирусных частиц; (е) макромолекул нуклеиновых кислот; (ж) белков; (з) нуклеопротеиновых комплексов; (и) органических соединений; (к) неорганических соединений; (л) вирусоподобных частиц.

Как показано на фиг. 2–4, согласно второй из своих сторон, изобретение касается устройства 1 для инфильтрации целевых компонентов Z в ткани вегетирующего растения 1. Это устройство 1 содержит:

- 5 • контейнер 20, адаптированный для герметизации,
- излучатель 21, расположенный внутри контейнера 20 и адаптированный для излучения ультразвуковых волн, при этом этот излучатель 21 также соединён с ультразвуковым генератором 26,
- источник 22 разрежения Ψ , соединённый с контейнером 20,
- 10 • первый регулятор 23 давления P, соединённый с контейнером 20,
- компрессор 24, соединённый с контейнером 20,
- второй регулятор 25 давления P, соединённый с контейнером 20,
- блок управления 27, селективно взаимодействующий с источником 22 разрежения Ψ , первым регулятором 23 давления P, компрессором 24,
- 15 • вторым регулятором 25 давления P, ультразвуковым генератором 26,

При этом, устройство 1 адаптировано для осуществления способа Ω инфильтрации целевых компонентов Z в ткани вегетирующего растения 1, согласно изобретению.

Блок управления 27 преимущественно оборудован (не показано):

- 20 – центральным процессором, называемым ЦПУ (по-английски, «Central Processing Unit»), снабженным хронометром и адаптированным для мильтипрограмной одновременной обработки данных,
- средствами памяти способными регистрировать данные (например, частоты, давления и т.п.) и/или сведения (например, правила),
- 25 – по меньшей мере одним устройством сопряжения человек-машина, включающим по меньшей мере одно средство отображения (преимущественно тактильный экран) и/или одно средство тревоги (звуковой, визуальной, тактильной, пахучей).

Как видно на фиг. 2-4, устройство 1 для инфильтрации может дополнительно содержать держатель 28 для селективной фиксации вегетирующего растения 1 внутри контейнера 20.

5 Как показано на фиг. 3, держатель 28 может быть сетчатого типа для селективной фиксации в нём вегетирующего растения. Сетчатый тип держатель 28 наиболее адаптирован для вегетирующих растений 1, стебель которых являет малую жесткость, то есть может сломаться в процессе инфильтрации из-за увеличения веса листьев 11 и/или семян 15.

10 На фиг. 4 представлен альтернативный держатель 28 каркасного типа. Он адаптирован для вегетирующих растений 1, стебель которых имеет достаточную жёсткость, чтобы удерживать такие вегетирующие растения 1 внутри контейнера 20 во время инфильтрации в вертикальном (то есть параллельном направлению вектора силы тяжести G) положении без механических повреждений. В примере на фигуре 4 держатель 28 15 каркасного типа содержит вырезы (ячейки), которые адаптированы для одновременного удержания восьми вегетирующих растений 1 (не показаны), что способствует повышению производительности устройство 1 для инфильтрации.

20 Преимущественно, источник разрежения 22 и компрессор 24 объединены друг с другом (не показано).

Преимущественно, первый регулятор 23 давления P и второй регулятор 25 давления P объединены друг с другом (не показано).

25 Преимущественно, устройство 1 для инфильтрации может дополнительно содержать рециркулятор (по-английски, «recirculator»), адаптированный для обеспечения циркуляции водной среды M в контейнере 20.

30 Наличие рециркулятора (не показан) способствует лучшему омыванию водной средой M предопределённой части 10 тканей вегетирующего растения 1, что повышает эффективность инфильтрации.

В частности, если в момент погружения E2 predeterminedенной части 10 тканей вегетирующего растения 1 в водную среду M произошёл случайный захват, например, листьями 11 или семенами 15, воздушных пузырьков (не показаны), которые могут снижать эффект ультразвукового воздействия, то течение, созданное внутри контейнера 20 позволяет механически оторвать эти воздушные пузырьки от растения 1 и эвакуировать их в свободный объем контейнера 20. Этот свободный объем расположен между свободной поверхностью водной среды M и внутренней поверхностью крышки 200 контейнера 20, когда последний 10 загерметизирован.

Преимущественно, устройство 1 для инфильтрации адаптировано для получения вирусоподобных частиц.

Согласно третьей из своих сторон, изобретение касается использования устройства 1 для инфильтрации целевых компонентов Z 15 в ткани вегетирующего растения 1, согласно изобретению, с целью создания вакцин.

Пример ниже иллюстрирует (см. также фиг. 1-4) один из вариантов осуществления способа Ω инфильтрации целевых компонентов Z в ткани вегетирующего растения 1, согласно изобретению.

Вегетирующие растения 1 (например, *Nicotiana benthamiana*), выращенные аэропнным способом, в условиях фитотрона, устанавливаются с помощью держателя 28 внутрь контейнера 20, который заполняется E1 водной суспензией агробактерий (например, *Agrobacter tumifaciens* и/или *Agrobacter rhizogenes*), несущих целевые 25 компоненты (например, гены). При этом, вегетирующие растения 1 целиком погружаются E2 в эту водную суспензию агробактерий с целевыми генами. Далее происходит герметизация E3 контейнера 20. Затем, вегетирующие растения 1 подвергаются E4 первичному ультразвуковому воздействию с первой частотой $\nu_1 = 22$ кГц работы 30 излучателя 21. При этом, первая длительность τ_1 работы излучателя 21

составляет 120 с, а первая плотность R_{1W} мощности (W) работающего в суспензии излучателя 21 составляет $0,7 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ в режиме дегазации. Затем, свободный объем контейнера 20, который расположен между свободной поверхностью суспензии и внутренней поверхностью крышки 5 200 контейнера 20, вакуумируется E5 до значений $0,5\cdot 10^5 \text{ Па}$, благодаря источнику 22 разрежения Ψ . При этом, вторая длительность τ_2 поддержания разрежения Ψ , созданного внутри контейнера 20 составляет 120 с. Далее происходит E6 регулируемый сброс вакуума с помощью первого регулятора 23 давления P, после чего происходит E7 10 первая опрессовка контейнера 20 с помощью компрессора 24. При этом, первое избыточное давление P_1 вдвое превышает атмосферное давление. В этих условиях вегетирующие растения 1 выдерживаются в течение третьей длительности τ_3 , которая составляет 120 с.

В результате общая длительность процесса составляет всего 15 360 с, что подтверждает возможность использования способа Ω инфильтрации целевых компонентов Z в ткани вегетирующего растения 1 при массовом производстве вакцин.

Библиография

1. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen 20 Q. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *J. Vis. Exp.* 77, e50521, 2013.

Формула изобретения

1. Способ (Ω) инфильтрации целевых компонентов (Z) в ткани вегетирующего растения (1), содержащий подготовительную фазу (Φ_1), включающую в себя следующие этапы:

- 5 • этап (E1) заполнения контейнера (20) водной средой (M), содержащей эти целевые компоненты (Z),
- этап (E2) погружения predetermined части (10) тканей вегетирующего растения (1) в водную среду (M) внутри контейнера (20),
- 10 • этап (E3) герметизации контейнера (20),

отличающийся тем, что этот способ (Ω) инфильтрации дополнительно содержит фазу обработки (Φ_2) тканей вегетирующего растения (1), которая следует за подготовительной фазой (Φ_1) и включает в себя следующие этапы:

- 15 • этап (E4) первичного ультразвукового воздействия на эту predetermined часть (10) тканей вегетирующего растения (1) с помощью излучателя (21), расположенного внутри контейнера (20) и погруженного в водную среду (M), при этом первая частота (ν_1) работы излучателя (21), первая длительность (τ_1) работы излучателя (21) и
- 20 первая плотность (R_{1W}) мощности (W) работающего излучателя (21) в водной среде (M) выбраны таким образом, чтобы обеспечить превышение порога кавитации этой водной среды (M),
- этап (E5) вакуумирования контейнера (20) с помощью источника (22) разрежения (Ψ), соединённого с контейнером (20), при этом
- 25 разрежение (Ψ), создаваемое внутри контейнера (20) источником (22) разрежения (Ψ), и вторая длительность (τ_2) поддержания разрежения (Ψ), созданного внутри контейнера (20), выбраны таким образом, чтобы обеспечить удаление остатков пузырьков воздуха из межклеточных пространств тканей вегетирующего растения (1),

- этап (E6) регулируемого сброса вакуума в контейнере (20) с помощью первого регулятора (23) давления (P), взаимодействующего с контейнером (20), при этом скорость открывания (Λ) первого регулятора (23) давления (P) такова, чтобы исключить вскипание водной среды (M),
- этап (E7) первой опрессовки контейнера (20) с помощью компрессора (24), соединённого с контейнером (20), при этом первое избыточное давление (P_1), создаваемое внутри контейнера (20) компрессором (24), и третья длительность (τ_3) поддержания созданного внутри контейнера (20) первого избыточного давления (P_1) выбраны таким образом, чтобы обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов (Z) в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения (1).

2. Способ (Ω) инфильтрации по пункту 1, отличающийся тем, что фаза обработки (Φ_2) тканей вегетирующего растения (1) дополнительно содержит этап (E8) вторичного ультразвукового воздействия на эту predetermined часть (10) тканей вегетирующего растения (1) с помощью излучателя (21), расположенного внутри контейнера (20) и погруженного в водную среду (M),

тем, что этап (E8) вторичного ультразвукового воздействия происходит одновременно с этапом (E7) опрессовки контейнера (20), и

тем, что вторая частота (ν_2) работы излучателя (21), четвертая длительность (τ_4) работы излучателя (21) и вторая плотность (R_{2W}) мощности (W) работающего излучателя (21) в водной среде (M) выбраны таким образом, чтобы обеспечить снижение диффузионных ограничений при введении целевых компонентов (Z) в межклеточные пространства тканей вегетирующего растения (1).

3. Способ (Ω) инфильтрации по пункту 2, отличающийся тем, что после этапа (E7) первой опрессовки, фаза обработки (Φ_2) тканей вегетирующего растения (1) дополнительно содержит этап (E9) полного

сброса первого избыточного давления (P_1) с помощью второго регулятора (25) давления (P), взаимодействующего с контейнером (20).

4. Способ (Ω) инфильтрации по пункту 3, **отличающийся тем, что** после этапа (E9) полного сброса первого избыточного давления (P_1), фаза обработки (Φ_2) тканей вегетирующего растения (1) дополнительно содержит этап (E10) второй опрессовки контейнера (20) с помощью компрессора (24), при этом второе избыточное давление (P_2) содержится в пределах от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $2,0 \cdot 10^5$ Па.

5. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 4, **отличающийся тем, что** во время этапа (E4) первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота (ν_1) работы излучателя (21) содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
- первая длительность (τ_1) работы излучателя (21) содержится в интервале от 10 с до 300 с, и
- первая плотность (R_{1W}) мощности (W) работающего излучателя (21) в водной среде (M) содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

6. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 4, **отличающийся тем, что** во время этапа (E4) первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота (ν_1) работы излучателя (21) содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
- первая длительность (τ_1) работы излучателя (21) содержится в интервале от 90 с до 120 с, и
- первая плотность (R_{1W}) мощности (W) работающего излучателя (21) в водной среде (M) содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

7. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 4, **отличающийся тем, что** во время этапа (E4) первичного ультразвукового воздействия:

- первая частота (ν_1) работы излучателя (21) составляет 32 кГц,
- 5 • первая длительность (τ_1) работы излучателя (21) содержится в интервале от 30 с до 60 с, и
- первая плотность (R_{1W}) мощности (W) работающего излучателя (21) в водной среде (M) содержится в интервале от $1,5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$ до $10 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-3}$.

10 8. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 7, **отличающийся тем, что** во время этапа (E5) вакуумирования контейнера (20):

- разрежение (Ψ), создаваемое внутри контейнера (20) источником (22) разрежения (Ψ), содержится в интервале от $0,1\cdot 10^5 \text{ Па}$ до $0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$, и
- 15 • вторая длительность (τ_2) поддержания разрежения (Ψ), созданного внутри контейнера (20), содержится в интервале от 60 с до 300 с.

9. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 7, **отличающийся тем, что** во время этапа (E5) вакуумирования контейнера (20):

- 20 • разрежение (Ψ), создаваемое внутри контейнера (20) источником (22) разрежения (Ψ), содержится в интервале от $0,1\cdot 10^5 \text{ Па}$ до $0,7\cdot 10^5 \text{ Па}$, и
- вторая длительность (τ_2) поддержания разрежения (Ψ), созданного внутри контейнера (20), содержится в интервале от 90 с до 300 с.

25 10. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 9, **отличающийся тем, что** во время этапа (E7) первой опрессовки контейнера (20):

- первое избыточное давление (P_1), создаваемое компрессором (24) внутри контейнера (20), содержится в интервале от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $10 \cdot 10^5$ Па, и
- третья длительность (τ_3) поддержания первого избыточного давления (P_1), созданного внутри контейнера (20), содержится в интервале от 60 с до 300 с.

11. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 9, **отличающийся тем, что** во время этапа (E7) первой опрессовки контейнера (20):

- первое избыточное давление (P_1), создаваемое компрессором (24) внутри контейнера (20), содержится в интервале от $1,5 \cdot 10^5$ Па до $10 \cdot 10^5$ Па, и
- третья длительность (τ_3) поддержания первого избыточного давления (P_1), созданного внутри контейнера (20), содержится в интервале от 90 с до 300 с.

12. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 2 до 11, **отличающийся тем, что** во время этапа (E8) вторичного ультразвукового воздействия:

- вторая частота (ν_2) работы излучателя (21) содержится в интервале от 20 кГц до 48 кГц,
- четвёртая длительность (τ_4) работы излучателя (21) содержится в интервале от 10 с до 300 с, и
- вторая плотность (R_{2W}) мощности (W) работающего излучателя в водной среде (M) содержится в интервале от $0,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$ до $1,5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-3}$.

13. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 12, **отличающийся тем, что** predetermined частью (10) вегетирующего растения (1), которая погружается в водную среду (M)

внутри контейнера (20), является всё целое вегетирующее растение (1), включающее в себя листья (11), стебли (12), корни (13), клубни (14), семена (15).

14. Способ (Ω) инфильтрации по любому одному из пунктов от 1 до 13, отличающийся тем, что водная среда (M) внутри контейнера (20) содержит водную суспензию по меньшей мере одного из следующих целевых компонентов (Z): (а) бактерий; (б) вирусов; (в) генетического материала, содержащего целевые гены; (г) генетического материала, содержащего гены белка оболочки вирусов; (д) вирусных частиц; (е) макромолекул нуклеиновых кислот; (ж) белков; (з) нуклеопротеиновых комплексов; (и) органических соединений; (к) неорганических соединений; (л) вирусоподобных частиц.

15. Устройство (1) для инфильтрации целевых компонентов (Z) в ткани вегетирующего растения (1), содержащее:

- 15 • контейнер (20), адаптированный для герметизации,
- излучатель (21), расположенный внутри контейнера (20) и адаптированный для излучения ультразвуковых волн, при этом этот излучатель (21) также соединён с ультразвуковым генератором (26),
- источник (22) разрежения (Ψ), соединённый с контейнером (20),
- 20 • первый регулятор (23) давления (P), соединённый с контейнером (20),
- компрессор (24), соединённый с контейнером (20),
- второй регулятор (25) давления (P), соединённый с контейнером (20),
- блок управления (27), селективно взаимодействующий с источником (22) разрежения (Ψ), первым регулятором (23) давления (P),
- 25 компрессором (24), вторым регулятором (25) давления (P), ультразвуковым генератором (26),

при этом устройство (1) адаптировано для осуществления способа (Ω) инфильтрации целевых компонентов (Z) в ткани вегетирующего растения (1) по любому одному из пунктов от 1 до 14.

16. Устройство (1) для инфильтрации по пункту 15, **отличающееся тем, что** оно дополнительно содержит держатель (28) для селективной фиксации вегетирующего растения (1) внутри контейнера (20).

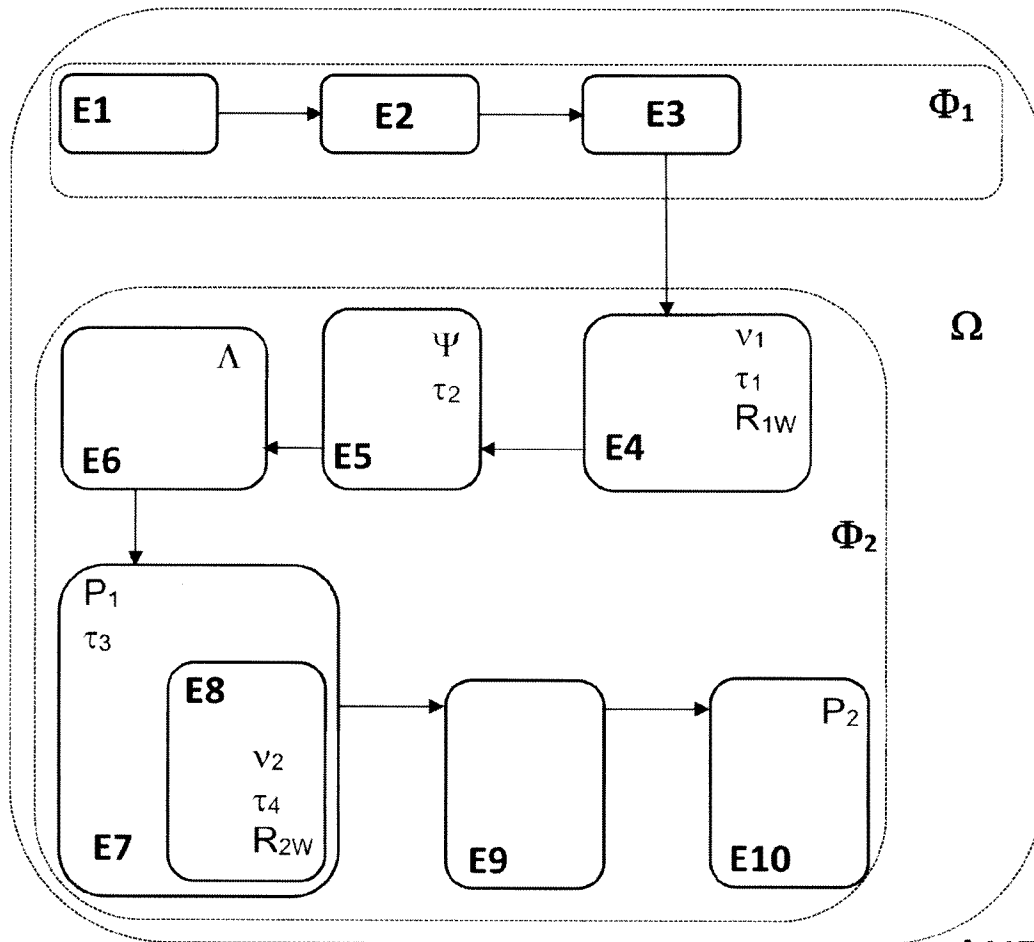
17. Устройство (1) для инфильтрации по пункту 15 или 16, **отличающееся тем, что** оно адаптировано для получения вирусоподобных частиц.

18. Устройство (1) для инфильтрации по любому одному из пунктов от 15 до 17, **отличающийся тем, что** источник разрежения (22) и компрессор (24) объединены друг с другом.

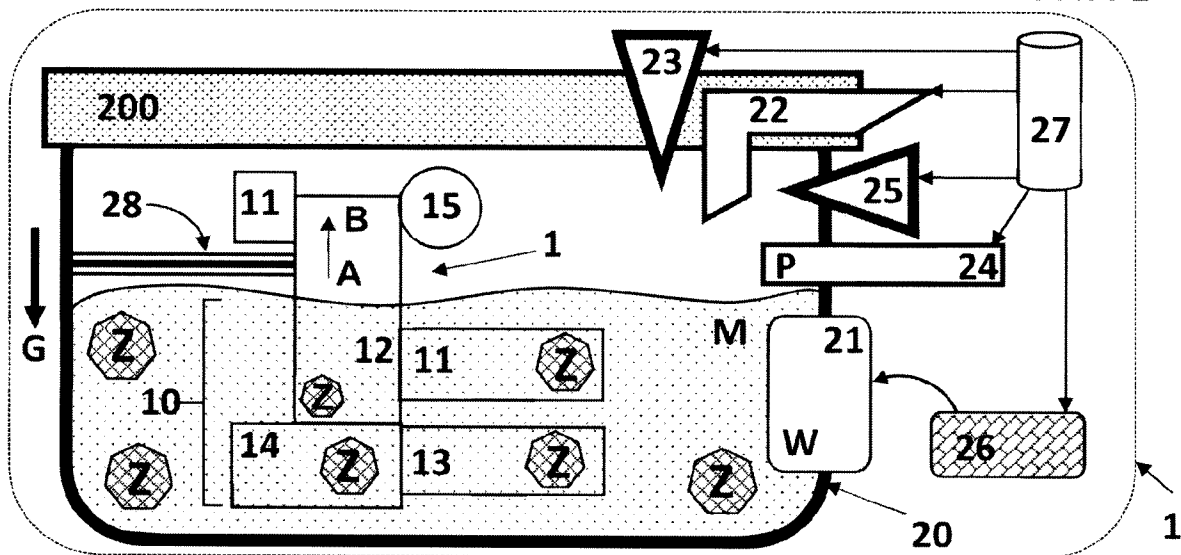
19. Устройство (1) для инфильтрации по любому одному из пунктов от 15 до 18, **отличающийся тем, что** первый регулятор (23) давления (P) и второй регулятор (25) давления (P) объединены друг с другом.

20. Использование устройства (1) для инфильтрации целевых компонентов (Z) в ткани вегетирующего растения (1) по любому одному из пунктов от 15 или 19 с целью создания вакцин.

1/3

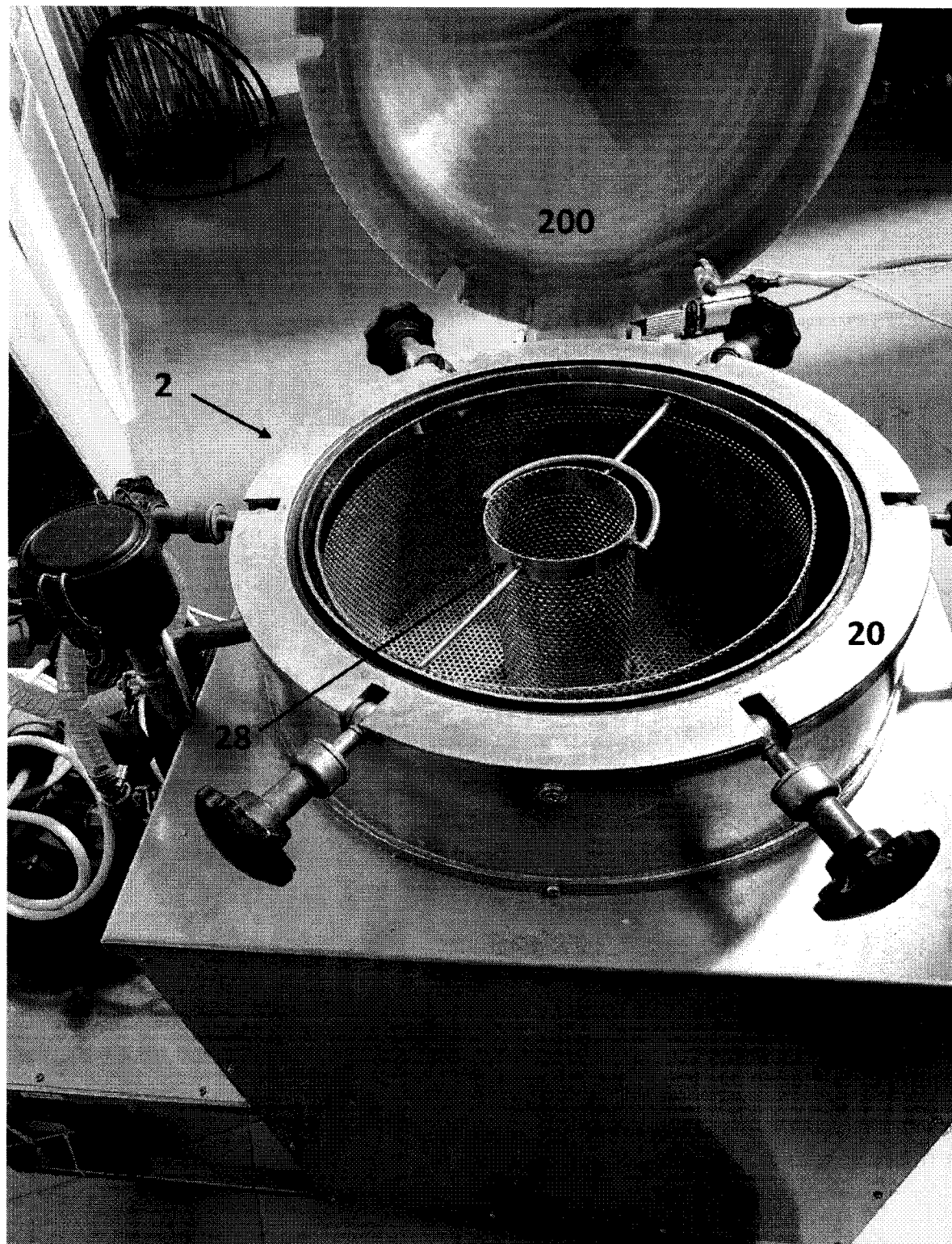


ФИГ. 1



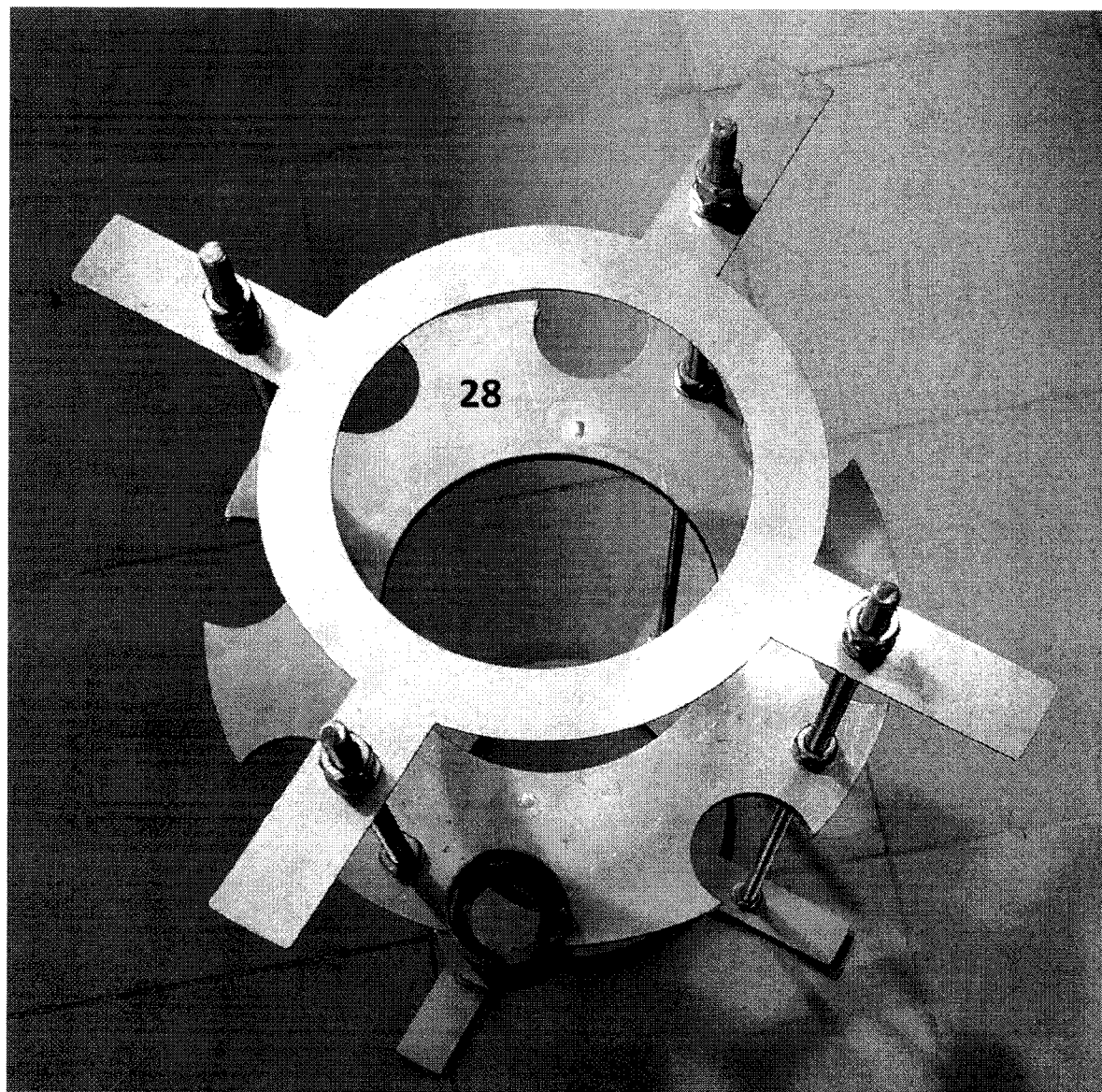
ФИГ. 2

2/3



ФИГ. 3

3/3



ФИГ. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2022/000224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see supplemental sheet) 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) A01H 1/00, A01H 1/06, C12N 5/00, C12N 5/04, C12M 1/42, C12M 3/00, C12N 15/00, C12N 15/02, C12N 15/05, C12N 15/82, A61K 39/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	LEUZINGER Kahlin et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. Journal of Visualized Experiments, 2013 Jul 23, (77):50521 DOI: doi:10.3791/50521, n.2.2, 3.2, figure 3	1-20
A	WO 2012/007587 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. et al.) 19.01.2012	1-20
A	WO 2019/173924 A1 (MEDICAGO INC. et al.) 19.09.2019	1-20
A	RU 2433963 C2 (BLANK POL EMANUILOVICH et al.) 20.11.2011	1-20
A	VIKTOREK-SMAGUR A. et al. Sravnenie dvukh metodov transformatsii. Arabidopsis thaliana: pogruzhenie tsvetochnykh pochek i vakuumnaia infiltratsiia. Fiziologiya rasteny, N4, tom 56, 2009, p. 619-628, the abstract	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	“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	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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	
“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)	“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	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 December 2022 (12.12.2022)	Date of mailing of the international search report 06 April 2023 (06.04.2023)	
Name and mailing address of the ISA/ RU	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 1/06 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 15/05 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000224

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p><i>A01H 1/06</i> (2006.01) <i>C12N 5/04</i> (2006.01) <i>C12M 1/42</i> (2006.01) <i>C12M 3/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/05</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																				
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>A01H 1/00, A01H 1/06, C12N 5/00, C12N 5/04, C12M 1/42, C12M 3/00, C12N 15/00, C12N 15/02, C12N 15/05, C12N 15/82, A61K 39/00</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p>PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS</p>																				
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>D, A</td> <td>LEUZINGER Kahlin et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. Journal of Visualized Experiments, 2013 Jul 23, (77):50521 DOI: doi:10.3791/50521, п.2.2, 3.2, фигура 3</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2012/007587 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. et al.) 19.01.2012</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019/173924 A1 (MEDICAGO INC. et al.) 19.09.2019</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RU 2433963 C2 (БЛАНК ПОЛЬ ЭМАНУИЛОВИЧ и др.) 20.11.2011</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ВИКТОРЭК-СМАГУР А. и др. Сравнение двух методов трансформации Arabidopsis thaliana: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация. Физиология растений, N4, том 56, 2009, с. 619-628, реферат</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	D, A	LEUZINGER Kahlin et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. Journal of Visualized Experiments, 2013 Jul 23, (77):50521 DOI: doi:10.3791/50521, п.2.2, 3.2, фигура 3	1-20	A	WO 2012/007587 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. et al.) 19.01.2012	1-20	A	WO 2019/173924 A1 (MEDICAGO INC. et al.) 19.09.2019	1-20	A	RU 2433963 C2 (БЛАНК ПОЛЬ ЭМАНУИЛОВИЧ и др.) 20.11.2011	1-20	A	ВИКТОРЭК-СМАГУР А. и др. Сравнение двух методов трансформации Arabidopsis thaliana: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация. Физиология растений, N4, том 56, 2009, с. 619-628, реферат	1-20
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																		
D, A	LEUZINGER Kahlin et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. Journal of Visualized Experiments, 2013 Jul 23, (77):50521 DOI: doi:10.3791/50521, п.2.2, 3.2, фигура 3	1-20																		
A	WO 2012/007587 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. et al.) 19.01.2012	1-20																		
A	WO 2019/173924 A1 (MEDICAGO INC. et al.) 19.09.2019	1-20																		
A	RU 2433963 C2 (БЛАНК ПОЛЬ ЭМАНУИЛОВИЧ и др.) 20.11.2011	1-20																		
A	ВИКТОРЭК-СМАГУР А. и др. Сравнение двух методов трансформации Arabidopsis thaliana: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация. Физиология растений, N4, том 56, 2009, с. 619-628, реферат	1-20																		
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																				
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>																				
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>12 декабря 2022 (12.12.2022)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>06 апреля 2023 (06.04.2023)</p>																		
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18</p>		<p>Уполномоченное лицо: Журавлева А. Телефон № 8(495)531-64-81</p>																		