



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.18

(21) Номер заявки
201790842

(22) Дата подачи заявки
2015.10.15

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) БЕЛКИ Cry1Da1 С ВАРИАНТАМИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ОБЛАДАЮЩИЕ АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ

(31) 62/064,994; 62/065,017

(32) 2014.10.16; 2014.10.17

(33) US

(43) 2017.08.31

(86) PCT/US2015/055779

(87) WO 2016/061377 2016.04.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС
(US)

(72) Изобретатель:
Баум Джеймс А., Черрути Томас,
Фласинский Станислав, Фу Сяожань,
Хау Эрлин Р., Сальвадор Сара Энн
(US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2005155103
WO-A2-2011041256
PARDO-LOPEZ L. ET AL.: "Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*", PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 30, no. 3, 19 August 2008 (2008-08-19), pages 589-595, XP025991581, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2008.07.027 [retrieved on 2008-08-19] figure 2

WAGNER LUCENA ET AL.: "Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins", TOXINS, vol. 6, no. 8, 13 August 2014 (2014-08-13), pages 2393-2423, XP55238443, DOI: 10.3390/toxins6082393 table 1

SARASWATHY NACHIMUTHU ET AL.: "Protein engineering of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*", EJB ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, CONICYT, SANTIAGO, CL, vol. 7, no. 2, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 178-188, XP002681430, ISSN: 0717-3458 tables 1, 2

KIM Y. S. ET AL.: "Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene and its insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Ostrinia furnacalis*", BIOLOGICAL CONTROL, SAN DIEGO, CA, US, vol. 47, no. 2, 29 July 2008 (2008-07-29), pages 222-227, XP025480667, ISSN: 1049-9644, DOI: 10.1016/J.BIOCONTROL. 2008.07.011 [retrieved on 2008-07-29] figure 3

YU REN ET AL.: "Effect of Cry1Ca7 protein modified by site-directed mutagenesis on inhibiting *Spodoptera exigua* Hubner", ACTA MICROBIOLOGICA SINICA - WEISHENGWU XUEBAO, vol. 48, no. 6, 4 June 2008 (2008-06-04), pages 733-738, XP55238869, abstract; table 4

WO-A1-2014055881

H. HOFTE ET AL.: "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of new *Lepidoptera*-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 18, 25 September 1990 (1990-09-25), pages 5545-5545, XP55238596, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/18.18.5545 cited in the application the whole document

HOFTE H. ET AL.: "INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*", MICROBIOLOGICAL REVIEWS, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 53, June 1989 (1989-06), pages 242-255, XP000374163, ISSN: 0146-0749 figure 2; table 1

CRICKMORE N. ET AL.: "Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 62, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 807-813, XP002132141, ISSN: 1092-2172 table 1

EP-A2-0358557

F. RAJAMOCHAN ET AL.: "Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* -endotoxin: Mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 93, no. 25, 10 December 1996 (1996-12-10), pages 14338-14343, XP55278189, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.93.25.14338 abstract; table 1

(57) Предложены сконструированные аминокислотные последовательности Cry1Da, обладающие улучшенной инсектицидной активностью в отношении чешуекрылых и расширенным спектром в отношении чешуекрылых по сравнению с природным белковым токсином Cry1Da. Также предложены полинуклеотидные последовательности, предназначенные для применения в экспрессии улучшенных белков в растениях. В конкретных вариантах реализации изобретения предложены композиции, содержащие инсектицидно ингибирующее количество

сконструированных белков, а также рекомбинантные растения, части растений и семена, содержащие полинуклеотидные конструкции, кодирующие один или более из улучшенных сконструированных белков.

034764 B1

034764 B1

Ссылка на родственные заявки

В данной заявке заявляется приоритет по предварительным заявкам США 62/064994, поданной 16 октября 2014 г. и 62/065017, поданной 17 октября 2014 г., которые включены в полном объеме в настоящий документ посредством ссылок.

Включение перечня последовательностей

Машиночитаемая форма перечня последовательностей подана в электронном виде. Перечень последовательностей, включенный посредством ссылки в полном объеме, содержится в файле, созданном 13 октября 2015 г., с именем файла P34223WO00_SEQ_PCT.txt и размером 327235 байт (измерено в операционной системе MS-Windows®).

Область изобретения

Изобретение в целом относится к области белков, оказывающих ингибирующее действие на насекомых. Раскрывается новый класс сконструированных белков, проявляющих инсектицидную ингибирующую активность против сельскохозяйственных вредителей сельскохозяйственных культур и семян. В частности, раскрытый класс сконструированных ингибирующих белков обладает инсектицидной активностью в отношении чешуекрылых насекомых-вредителей. Предусмотрены растения, части растений и семена, содержащие полинуклеотидный конструкт, кодирующий один или более описанных сконструированных ингибирующих белков.

Уровень техники

Helicoverpa zea является характерным чешуекрылым вредителем основных сельскохозяйственных культур, включая кукурузу, хлопчатник и сою. Известный как кукурузная совка (CEW), хлопковая совка (CBW) и коробочный червь (SPW), этот вид многоядных насекомых особенно трудно контролировать с помощью инсектицидных белков *Bacillus thuringiensis* (Bt) или других видов бактерий. *H. zea* считается подверженным риску развития резистентности к современным способам контроля насекомых, учитывая его способность питаться множеством различных культур и отсутствие в настоящее время стратегии контроля высоких доз. Соответственно, необходимы новые способы воздействия (CB) для обеспечения долговечности трансгенных растений, защищенных от повреждения в результате питания *H. zea*.

Белок Cry1Da1 является чешуекрыло-активным белком, который был впервые описан Hofte, et al. "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new Lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*." *Nucleic Acids Res.* 18(18) (1990): 5545. Данный белок проявляет отличную инсектицидную активность по отношению к видам рода *Spodoptera*, включая *Spodoptera frugiperda* (кукурузную листовую совку, FAW), вредителя некоторых пропашных культур, включая кукурузу, хлопчатник и сою. Однако Cry1Da1 проявляет низкую или умеренную активность по отношению к целому ряду других основных насекомых-вредителей, включая хлопковую сойку (например, *Helicoverpa armigera* и *H. zea*), огневка (например, *Ostrinia nubilalis* и *Diatraea grandiosella*) и соевую совку (*Pseudoplusia includens*). Из-за его узкого инсектицидного спектра и его неспособности обеспечить коммерческую защиту от ряда важных чешуекрылых сельскохозяйственных вредителей, таких как CEW, инсектицидный белок Cry1Da1 имеет ограниченное значение в качестве признака борьбы с насекомыми в трансгенных растениях. В результате никакие современные коммерческие сорта культур, защищенные от насекомых, не используют Cry1Da1 в качестве включенного в растение средства защиты.

Несмотря на свой узкий инсектицидный спектр, Cry1Da1 является интересным инсектицидным белком, потому что кажется, что белок Cry1Da1 использует альтернативные CB для борьбы с некоторыми насекомыми-вредителями. Доказательством этого служат исследования колоний насекомых с множественной устойчивостью. Например, полученные из поля колонии *Plutella xylostella* (капустной моли) и *Pectinophora gossypiella* (хлопковой моли), которые устойчивы к интоксикации Cry1Ac, сохраняют полную чувствительность к белку Cry1Da1 (Tabashnik et al. "Cross-Resistance of Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins." *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000). 4582-4584; Tabashnik, et al. "Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ja in a Strain of Diamondback Moth Adapted to Artificial Diet." *J. Invert. Pathol.* 76: 2000: 81-83. Эти данные свидетельствуют о том, что Cry1Da1 распознает рецепторы средней кишки чешуекрылых, отличные от тех, которые распознаются чешуекрыло-активными белками, которые в настоящее время внедрены в трансгенные сельскохозяйственные культуры, включая Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1Fa, Cry2Ae и Cry2Ab2. В свете данного очевидного нового CB оптимизация Cry1Da1-подобных белков для улучшения активности против более широкого спектра видов рода *Helicoverpa* при сохранении или увеличении их инсектицидной активности по отношению к видам рода *Spodoptera* могла бы создать включенную в растения, высококачественную защиту для борьбы с резистентностью насекомых.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении идентифицированы несколько вариантов аминокислотных последовательностей каркасных белков TIC844 и Cry1Da, которые проявляют заметно улучшенную активность (по сравнению с нативным токсином Cry1Da1) по отношению к *H. zea*, сохраняя при этом отличную активность по отношению к *S. frugiperda*. Улучшенные варианты TIC844 и Cry1Da были разработаны, для экспрессии в сельскохозяйственных растениях (например, кукурузе, сое, хлопке, сахарном тростнике), и предоставляют новые варианты для управления устойчивостью *in planta* (в растении) и борьбы с насеко-

мыми-вредителями в силу очевидного уникального способа воздействия Cry1Da в сочетании с улучшенной активностью против *H. zea*.

Описанные в настоящем документе сконструированные токсичные белки чешуекрылых (называемые в настоящем документе "сконструированные белковые токсины", "сконструированные токсичные белки" или "сконструированные инсектицидные белки") являются производными природного инсектицидного токсина *Bacillus thuringiensis* Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) или химерного гомолога Cry1Da1, TIC844 (SEQ ID NO: 14), которые содержат основной токсин Cry1Da1, но имеют замененный протоксин Cry1Ab3 на нативный Cry1Da1-протоксинавый домен. Сконструированные инсектицидные белки согласно настоящему изобретению каждый содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, одно аминокислотное присоединение или одну аминокислотную делецию по сравнению с каркасными белками, представленными в любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. Сконструированные инсектицидные белки согласно настоящему изобретению особенно токсичны для насекомых видов *Helicoverpa zea* (кукурузная совка, хлопковая совка, коробочный червь) и *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка). Хотя белки каркасные TIC844 (SEQ ID NO: 14) и Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) проявляют низкую токсичность в отношении *H. zea*, инсектицидные белки, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают удивительной и неожиданно улучшенной инсектицидной активностью и улучшенным инсектицидным спектром против чешуекрылых насекомых-вредителей, включая *H. zea*.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 42, или ее фрагмент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых. В некоторых вариантах реализации изобретения инсектицидный белок проявляет ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда *Lepidoptera* (Чешуекрылые). Виды чешуекрылых вредителей, которые имеют негативное влияние на сельское хозяйство, включают, без ограничения, кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малую (*Spodoptera exigua*), совку латуковую (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Chrysodeixis includens*), совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatilis*), совку клеверную (*Hyperba scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*), мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), бабочку-огневку (*Amyelois transitella*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), огневку подсолнечниковую (*Homoeosoma electellum*), точильщика зернового кукурузного (*Elasmopalpus lignosellus*), плодоядку яблонную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), листовертку восточную персиковую (*Grapholita molesta*), листовертку почковую подсолнечника (*Suleima helianthana*), капустную моль (*Plutella xylostella*), розового коробочного червя (*Pectinophora gossypiella*), розовую стеблевую совку (*Sesamia inferens*), шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*), совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*), листовертку плодовых деревьев (*Archips argyrospila*), листовертку резанную золотистую (*Archips rosana*), огневку азиатскую стеблевую или огневку желтую рисовую (*Chilo suppressalis*), листовертку рисовую (*Cnaphalocrocis medinalis*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), мотылька травяного (*Crambus teterrellus*), огневку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), огневку сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), совку хлопковую египетскую (*Earias insulana*), совку пятнистую (*Earias vittella*), совку американскую (*Helicoverpa armigera*), совку хлопковую или американскую кукурузную совку (*Helicoverpa zea*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), гроздевую листовертку (*Lobesia botrana*), цитрусовую минурующую моль (*Phyllocnistis citrella*), белянку капустную (*Pieris brassicae*), репницу или белянку репную (*Pieris rapae*), азиатскую хлопчатниковую совку или азиатскую хлопковую совку (*Spodoptera litura*) и пасленового минера (*Tuta absoluta*).

Также в настоящем документе раскрыт полинуклеотид, кодирующий сконструированный инсектицидный белок или его фрагмент, обладающий пестицидной активностью, причем полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, а сконструированный инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 42.

В другом варианте реализации изобретения в настоящем документе раскрыт полинуклеотид, кодирующий сконструированный инсектицидный белок, причем полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая необязательно гибридизуется в строгих условиях с обратным комплементом полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 41; или кодирует сконструированный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 44,

SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 42.

Также в настоящем документе предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, представленный в любой из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 41, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки-хозяина или растительной клетки-хозяина. Рассматриваемые бактериальные клетки-хозяева включают бактериальные клетки-хозяева, выбранные из группы, состоящей из *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, и *Erwinia*, причем вид рода *Bacillus* представляет собой *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанный *Brevibacillus* представляет собой *Brevibacillus laterosporus*, а указанная *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*. Кроме того, предполагаемые растительные клетки-хозяева включают однодольные или двудольные растения.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложена композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащая сконструированный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 42, или ее фрагмент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых. Предполагается, что данная композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых может дополнительно содержать по меньшей мере один агент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых, отличный от сконструированного инсектицидного белка. Рассматриваемые агенты, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, включают белок, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых, молекулу дцПНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых и химический состав, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых. Предполагается, что, по меньшей мере, один другой пестицидный агент может проявлять активность в отношении одного или нескольких видов вредителей отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Homoptera* или *Thysanoptera*.

Также раскрыто в настоящем документе семя, содержащее ингибирующе эффективное в отношении насекомых количество сконструированного инсектицидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 42; или полинуклеотид, указанный в любой из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 41.

Способ борьбы с чешуекрылыми насекомыми-вредителями, включающий приведение в контакт чешуекрылого насекомого-вредителя с ингибирующим количеством сконструированного инсектицидного белка, также раскрыт в настоящем документе в другом варианте реализации изобретения.

В еще одном варианте реализации изобретения, в настоящем документе раскрыта трансгенная клетка растения, растение или часть растения, содержащие сконструированный инсектицидный белок. Предложены способы борьбы с чешуекрылым насекомым-вредителем, включающие предоставление вредителю трансгенной клетки растения, растения или части растения, содержащих сконструированный инсектицидный белок.

Рассматриваются также товарные продукты, полученные из клетки растения, растения или части растения, содержащие сконструированный инсектицидный белок, причем продукт содержит определяемое количество сконструированного инсектицидного белка. Рассматриваемые товарные продукты включают биомассу растений, масло, муку грубого помола, корм для животных, муку, хлопья, отруби, волокно, кожуру и обработанные семена.

Другой способ, раскрытый в настоящем документе, представляет собой способ получения семени, содержащего сконструированный инсектицидный белок, включающий стадии, на которых: высаживают по меньшей мере одно семя, содержащее сконструированный инсектицидный белок; выращивают растение из указанного семени; и собирают семена от растений, причем собранное семя содержит инсектицидный белок.

Еще один способ, раскрытый в данной заявке, представляет собой способ ингибирования активности чешуекрылых насекомых-вредителей от кормления на культурном растении, включающий модификацию одного или нескольких аминокислотных остатков SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 путем замещения одного или более аминокислотного(-ых) остатка(-ов) для получения модифицированной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и получения доступного количества обладающей ингибирующей активностью в отношении чешуекрылых модифицированной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 внутри, на поверхно-

сти или вблизи тканей указанного культурного растения; причем модифицированный аминокислотный остаток SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 выбран из группы, состоящей из серина в положении 282, замененного лизином или валином, тирозина в положении 316, замененного серином, изолейцина в положении 368, замененного пролином или аргинином, серина в положении 374, замененного аргинином, аспарагина в положении 375, замененного гистидином и изолейцина в положении 432, замененного лейцином.

Также предложены рекомбинантные полинуклеотидные молекулы, кодирующие сконструированные инсектицидные белки согласно настоящему изобретению. Рассматриваемые рекомбинантные полинуклеотидные молекулы содержат полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 41; и, необязательно, полинуклеотидную последовательность, кодирующую агент, обладающий ингибиторной активностью в отношении насекомых, отличный от инсектицидного белка.

Другой способ, раскрытый в настоящем заявке, представляет собой способ увеличения активности в отношении чешуекрылых и усиления спектра ингибирования чешуекрылых у каркасного белка, включающий модификацию одного или более аминокислотного(-ых) остатка(-ов) SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 путем замещения аминокислотного(-ых) остатка(-ов) для получения сконструированного инсектицидного белка, причем модифицированный аминокислотный остаток SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 выбран из группы, состоящей из серина в положении 282, замененного лизином или валином, тирозина в положении 316, замененного серином, изолейцина в положении 368, замененного пролином или аргинином, серина в положении 374, замененного аргинином, аспарагина в положении 375, замененного гистидином и изолейцина в положении 432, замененного лейцином. В некоторых вариантах реализации данного способа сконструированный инсектицидный белок имеет по меньшей мере восьмикратно увеличенную летальность *Helicoverpa zea* по сравнению с каркасным белком.

Другие варианты реализации, особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания, примеров и формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены значения MIC₅₀ (минимальной ингибирующей концентрации) каркасного белка TIC844 (SEQ ID NO: 14), по сравнению со сконструированным инсектицидным белком TIC844_8 (SEQ ID NO: 26) для двух различных колоний *Helicoverpa zea* (CEW) - "Union City" и "Benzon".

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1.

SEQ ID NO: 3 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1_3.

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_3.

SEQ ID NO: 5 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1_4.

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_4.

SEQ ID NO: 7 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1_5.

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_5.

SEQ ID NO: 9 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1_6.

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_6.

SEQ ID NO: 11 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cry1Da1_7.

SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_7.

SEQ ID NO: 13 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844.
TIC844.

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_2.

SEQ ID NO: 16 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_2.

SEQ ID NO: 17 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_4.

SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_4.

SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_5.

SEQ ID NO: 20 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_5.

SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_6.

SEQ ID NO: 22 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_6.

SEQ ID NO: 23 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_7.

SEQ ID NO: 24 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_7.

SEQ ID NO: 25 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TIC844_8.

SEQ ID NO: 26 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_8.

SEQ ID NO: 27 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1 в растениях.

SEQ ID NO: 28 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1.

SEQ ID NO: 29 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_2.nno в растениях.

SEQ ID NO: 30 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_2.nno.

SEQ ID NO: 31 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_3.nno в растениях.

SEQ ID NO: 32 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_3.nno.

SEQ ID NO: 33 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_4.nno в растениях.

SEQ ID NO: 34 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_4.nno.

SEQ ID NO: 35 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_5.nno в растениях.

SEQ ID NO: 36 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_5.nno.

SEQ ID NO: 37 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_6.nno в растениях.

SEQ ID NO: 38 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_6.nno.

SEQ ID NO: 39 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка Cry1Da1_7.nno в растениях.

SEQ ID NO: 40 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина Cry1Da1_7.nno.

SEQ ID NO: 41 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка TIC844_9.nno в растениях.

SEQ ID NO: 42 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_9.nno.

SEQ ID NO: 43 представляет собой полинуклеотидную последовательность, сконструированную для экспрессии белка TIC844_11.nno в растениях.

SEQ ID NO: 44 представляет собой аминокислотную последовательность белкового токсина TIC844_11.nno.

Подробное описание изобретения

В настоящем документе представлены сконструированные инсектицидные белки, демонстрирующие удивительно более высокие уровни токсической активности против видов отряда Чешуекрылые и более широкий инсектицидный спектр по сравнению с другими ранее известными инсектицидными белками чешуекрылых. Эти сконструированные инсектицидные белки получают из каркасных инсектицидных белков, которые служат в качестве шаблонов для различных аминокислотных модификаций. Приме-

ры таких каркасных инсектицидных белков включают, но не ограничиваются ими, Cry1Da1 и TIC844 (гомолог Cry1Da1). TIC844 содержит основной токсин Cry1Da1 (т.е. домены I, II и III), но использует домен протоксина Cry1Ab3 для обеспечения хорошей экспрессии в *Bacillus thuringiensis* (Bt). Экспрессия Cry1Da1 в Bt является плохой при использовании родного домена протоксина Cry1Da1. Однако, как показано в настоящей заявке, экспрессия основного токсина Cry1Da1 заметно улучшается в некристаллообразующих штаммах Bt, когда удаляется нативный протоксиновый домен, а сегмент кодирования основного токсина Cry1Da1 слит с сегментом, кодирующим протоксиновый домен Cry1Ab3. Примечательно, что белки TIC844 (SEQ ID NO: 14) и Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) не демонстрируют коммерчески полезный спектр ингибирования чешуекрылых и улучшенную ингибирующую активность в отношении чешуекрылых, наблюдаемую у сконструированных инсектицидных белков.

Сконструированные инсектицидные белки, описанные в настоящем изобретении, связаны с модификациями аминокислот, так что модифицированные белки обладают улучшенным спектром ингибирования чешуекрылых и/или улучшенной ингибирующей активностью в отношении чешуекрылых по сравнению с исходным каркасным белком TIC844 или Cry1Da1. Фразы "более активный", "улучшенная активность", "повышенная специфичность", "повышенная токсическая активность", "повышенная токсичность", "улучшенная ингибирующая активность в отношении чешуекрылых", "более высокая ингибирующая активность в отношении чешуекрылых" и "усиленный спектр ингибирования чешуекрылых" относятся к сопоставлению активности сконструированного инсектицидного белка с активностью каркасного белка (TIC844 или Cry1Da1) против насекомого-чешуекрылого, причем активность, приписываемая сконструированному инсектицидному белку, больше, чем активность, приписываемая каркасному белку. В некоторых вариантах реализации изобретения инсектицидные белки, предложенные в настоящем документе, обладают улучшенным спектром ингибирования чешуекрылых и/или улучшенной или большей ингибирующей активностью в отношении чешуекрылых по сравнению с активностью каркасного белка TIC844 или Cry1Da1, причем виды чешуекрылых-вредителей включают, но не ограничиваются ими, *Helicoverpa zea* и *Spodoptera frugiperda*.

Используемые в настоящем документе термины и фразы "активный" или "активность"; "пестицидная активность" или "пестицидный"; или "инсектицидная активность", "ингибирующая инсектицидная активность", "инсектицидный" или "инсектицидно ингибирующее количество", относятся к эффективности токсичного агента, такого как инсектицидный белок, в ингибировании (ингибировании роста, кормления, плодовитости или жизнеспособности), подавлении (подавлении роста, кормления, плодовитости или жизнеспособности), контроле (контроле заражения вредителями, контроле активности кормления вредителями на определенной культуре, содержащей эффективное количество описанного инсектицидного белка) или уничтожении (вызывая заболеваемость, смертность, или снижение плодовитости) вредителя. Точно так же "количество, оказывающее ингибирующую активность на чешуекрылых" относится к количеству токсичного агента, такого как инсектицидный белок, что приводит к любому измеримому ингибированию жизнеспособности чешуекрылых, росту чешуекрылых, развитию чешуекрылых, размножению чешуекрылых, кормовому поведению чешуекрылых, брачному поведению чешуекрылых и/или любому измеримому снижению неблагоприятных эффектов, испытываемых растением от питания чешуекрылых. Эти термины призваны включать результат обеспечения пестицидно эффективного количества токсичного агента для вредителя, при котором предоставление вредителю токсичного агента приводит к заболеваемости, смертности, снижению плодовитости или задержке роста. Эти термины также включают отталкивание вредителя от растения, ткани растения, части растения, семени, клеток растения или от конкретного географического положения, где растение может произрастать, в результате предоставления пестицидно эффективного количества токсичного агента в или на растении. В общем, пестицидная активность относится к способности токсичного агента быть эффективным в ингибировании роста, развития, жизнеспособности, кормового поведения, брачного поведения, плодовитости или любого измеримого снижения, вызванного неблагоприятными эффектами, в связи с предоставлением в рацион насекомого данного белка, фрагмента белка, сегмента белка или полинуклеотида, конкретному целевому вредителю, включая, но не ограничиваясь ими, насекомых отряда *Lepidoptera*. Токсичный агент может быть продуцирован растением или может быть применен к растению или в окружающей среде в том месте, где находится растение.

Пестицидно эффективное количество токсического агента, если оно предусмотрено в рационе целевого вредителя, проявляет пестицидную активность, когда токсичность попадает в организм вредителя. Токсичный агент может представлять собой пестицидный белок, или один или более химических агентов, известных в данной области техники. Пестицидные или инсектицидные химические агенты и пестицидные или инсектицидные белковые агенты могут быть использованы по отдельности или в сочетании друг с другом. Химические агенты включают, но не ограничиваются ими, молекулы дцРНК, нацеленные на специфические гены для подавления в целевом вредителе, органохлориды, органофосфаты, карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды и риаиноиды. Пестицидные или инсектицидные белковые агенты включают сконструированные инсектицидные белки, представленные в данной заявке, а также другие белковые токсичные агенты, включая те, которые нацелены на разновидности чешуекрылых, а также белковые токсины, которые используются для борьбы с другими вредителями растений, такие как белки Cry, дос-

тупные в данной области техники для применения при борьбе с видами родов Coleopteran, Hemipteran и Homopteran.

Термин "сегмент" или "фрагмент" используется в настоящем документе для описания последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот, которые короче, чем полная аминокислотная или нуклеотидная последовательность, описывающая сконструированные инсектицидные белки.

Предполагается, что упоминание вредителя, особенно вредителя сельскохозяйственного растения, означает насекомых-вредителей культурных растений, особенно тех чешуекрылых насекомых-вредителей, которые контролируются описанными инсектицидными белками. Однако упоминание вредителя может также включать насекомых-вредителей отрядов Coleoptera (Жесткокрылые), Hemiptera (Полужесткокрылые) и Homoptera (Равнокрылые), а также нематод и грибы, в случае, если токсические агенты, нацеленные на этих вредителей, совместно локализируются или присутствуют вместе с описанными инсектицидными белками.

Раскрытые сконструированные инсектицидные белки проявляют инсектицидную активность по отношению к насекомым-вредителям из видов насекомых отряда Чешуекрылые, включая имаго, куколок, личинок и новорожденных. Насекомые отряда Lepidoptera, включают, без ограничений, совок луговых, совок, листоверток, и совок из семейства Noctuidae, например, кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малую (*Spodoptera exigua*), совку латуковую (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Pseudoplusia includens*), совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatilis*), совку клеверную (*Hyperba scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*); точильщиков, чехлоносок, бабочек, огневок Шишковых, гусениц бабочки капустницы и пироморфид из семейства Pyralidae, например, мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), бабочку-огневку (*Amyelois transitella*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), огневку подсолнечниковую (*Homoeosoma electellum*), точищика зернового кукурузного (*Elasmopalpus lignosellus*); листоверток, дымчатых листоверток, плодояжорок и плодовых листоверток из семейства Tortricidae, например, плодояжорку яблонную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), листовертку восточную персиковую (*Grapholita molesta*), листовертку подсолнечника (*Suleima helianthana*); и многих других экономически важных представителей отряда Lepidoptera, например, капустную моль (*Plutella xylostella*), розового коробочного червя (*Pectinophora gossypiella*) и шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Другие насекомые-вредители отряда Lepidoptera включает, например, *Alabama argillacea* (совка хлопковая американская), *Archips argyrospila* (листовертка плодовых деревьев), *Archips rosana* (листовертка резанная золотистая) и другие виды *Archips*, *Chilo suppressalis* (огневка азиатская стеблевая или желтая рисовая огневка), *Snaphalocrocis medinalis* (листовертка рисовая), *Crambus caliginosellus* (кукурузная огневка), *Crambus teterrellus* (мотылек травяной), *Diatraea grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная), *Diatraea saccharalis* (огневка сахарного тростника), *Earias insulana* (совка хлопковая египетская), *Earias vittella* (совка пятнистая), *Helicoverpa armigera* (совка американская), *Helicoverpa zea* (совка хлопковая или американская кукурузная совка), *Heliothis virescens* (табачная листовертка), *Herpetogramma licarsisalis* (луговой мотылек), *Lobesia botrana* (гроздевая листовертка), *Phyllocnistis citrella* (цитрусовая минующая моль), *Pieris brassicae* (белянка капустная), *Pieris rapae* (репница или белянка репная), *Plutella xylostella* (капустная моль), *Spodoptera exigua* (совка малая), *Spodoptera litura* (азиатская хлопчатниковая совка, азиатская хлопковая совка) и *Tuta absoluta* (пасленовый минер).

Указанная в настоящей заявке "выделенная молекула ДНК" или эквивалентный термин или фраза означает, что молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в сочетании с другими композициями, но не в ее естественной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и т.п., которые, естественно, находятся в ДНК генома организма, не считаются "выделенными" до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том месте, где он находится, в естественном геноме. Тем не менее, каждый из этих элементов и их части были бы "выделенными" в рамках данного описания, если элемент не находится внутри генома организма и в том месте, где он находится, в геноме, в котором он естественным образом находится. Точно так же нуклеотидная последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет представлять собой выделенную нуклеотидную последовательность, если нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, в которой естественным образом находится последовательность, кодирующая белок. Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность природного инсектицидного белка, будет считаться выделенной для целей настоящего описания. Для целей настоящего описания любая трансгенная нуклеотидная последовательность, то есть нуклеотидная последовательность ДНК, встроенная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она в плазмиде или подобной структуре, используемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии, или присутствует в обнаруживаемых коли-

чествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из растения или бактерии.

Как описано далее в примерах, повторяющиеся циклы конструирования, тестирования и отбора более двух тысяч (2000) вариантов аминокислотной последовательности TIC844 и Cry1Da1 привели к идентификации определенных аминокислотных остатков, которые могут быть замещены, вставлены или удалены из данного каркасного белка для получения искусственных инсектицидных белков, которые обладают расширенным спектром ингибирования чешуекрылых и/или улучшенной ингибирующей активностью в отношении чешуекрылых (т.е. более токсичным; меньшее количество инсектицидного белка, необходимо для получения того же уровня смертности) по сравнению со спектром и активностью базовых каркасных белков, TIC844 или Cry1Da1. Эти повторяющиеся этапы конструирования, тестирования и отбора также привели к идентификации замещений, вставок или делеций нейтральных аминокислотных остатков в каркасных белках TIC844 и Cry1Da1, которые не изменяют ингибирующий спектр или активность в отношении насекомых. Конкретные аминокислотные остатки в каркасе TIC844 и Cry1Da1, которые могут быть модифицированы для получения улучшенного спектра ингибирования чешуекрылых и/или улучшенной ингибирующей активности в отношении чешуекрылых, по сравнению с TIC844 или Cry1Da1, идентифицированы в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения сконструированный инсектицидный белок, предложенный в настоящем документе, может проявлять примерно восьмикратную или большую ингибирующую активность в отношении чешуекрылых против видов вредителей отряда Чешуекрылые, по сравнению с каркасным белком SEQ ID NO: 14 (TIC844) или SEQ ID NO: 2 (Cry1Da1).

Термин "конструирование" в этих повторяющихся циклах включал определение релевантных остатков в каркасном белке для модификации с целью создания модифицированного тестового белка и клонирование и экспрессию полученных модифицированных тестовых белков. Атомарная структура каркасных белков была использована для направления и дополнения полуслучайных подходов к выбору аминокислотных остатков для модификации при конструировании. Термин "тестирование" в этих повторяющихся циклах включал сравнение видоспецифичных видовых активностей модифицированного тестового белка с его исходным каркасным белком. Термин "отбор" в этих повторяющихся циклах включал идентификацию модифицированных тестовых белков с улучшенной активностью (улучшенные варианты) и соответствующих остатков, которые были сконструированы для создания этих улучшенных вариантов (эти улучшенные варианты называются в настоящем документе "сконструированными инсектицидными белками").

Примерами способов тестирования и отбора сконструированных инсектицидных белков являются введение одинаковых количеств модифицированного тестового белка и каркасного белка (TIC844 или Cry1Da1) насекомому-вредителю в контролируемых условиях анализа и измерение, и сравнение эффективности модифицированных тестовых белков и каркасных белков. Другой способ тестирования и отбора сконструированных инсектицидных белков включает определение доз белка (например, концентрации белка в рационе) модифицированного тестового белка и каркасного белка (TIC844 или Cry1Da1), которые вызывают эквивалентные ответы популяции насекомых в контролируемых условиях анализа (то есть, получение кривой зависимости доза-эффект). Для сравнения использовалась статистически значимая величина дозы, используемая для сравнения: средняя летальная концентрация (LC_{50}), необходимая для уничтожения 50% исследуемой популяции или концентрации ингибирования линьки (" MIC_{50} "), медианная концентрация, необходимая для ингибирования линьки на 50%).

В некоторых вариантах реализации изобретения сконструированные инсектицидные белки, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в следующих относительных положениях TIC844 (SEQ ID NO: 14) или Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2): серии в положении 282 замещенный лизином или валином, тирозин в положении 316 замещенный серином, изолейцин в положении 368 замещенный пролином или аргинином, серии в положении 374 замещенный аргинином, аспарагин в положении 375 замещенный гистидином и изолейцин в положении 432 замещенный лейцином. Сконструированные инсектицидные белки могут также содержать по меньшей мере две, три, четыре или более из этих аминокислотных замещений или делеций в рамках одной и той же сконструированной инсектицидной последовательности белка.

Сконструированные инсектицидные белки, которые содержат данные аминокислотные модификации, включают белки, представленные как SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 44, и их фрагменты, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых. Каждый из этих сконструированных инсектицидных белков имеет измеренную массу около 132 кДа. Отдельные характеристики инсектицидных каркасных белков TIC844 и Cry1Da1 и сконструированных инсектицидных белков, полученных из них, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики TIC844, Cry1Da1 и сконструированных инсектицидных белков

Белок (Название/SEQ ID NO.)	Молекулярная масса (в дальтонах)	Аминокислотная длина	Изoeлектрическая точка	Заряд при pH 7,0	Количество сильноосновных (-) аминокислот	Количество сильнокислых аминокислот	Количество гидрофобных аминокислот	Количество полярных аминокислот
Cry1Da1/ NO:2	132481,87	1165	5,087	-39,319	113	156	388	347
Cry1Da1_ 3/NO:4	132405,77	1165	5,087	-39,318	113	156	388	347
Cry1Da1_ 4/NO:6	132550,98	1165	5,112	-38,319	114	156	388	346
Cry1Da1_ 5/NO:8	132448,80	1165	5,112	-38,318	114	156	387	347
Cry1Da1_ 6/NO:10	132430,82	1165	5,112	-38,319	114	156	387	346
Cry1Da1_ 7/NO:12	132401,78	1165	5,087	-39,318	113	156	388	346
TIC844/ NO:14	129182,91	1139	5,026	-39,540	110	153	382	340
TIC844_2 /NO:16	129129,85	1139	5,048	-39,373	110	153	382	339
TIC844_4 /NO:18	129106,81	1139	5,026	-39,539	110	153	382	340
TIC844_5 /NO:20	1291118,08	1069	5,325	-27,535	105	136	363	321
TIC844_6 /NO:22	129252,02	1139	5,050	-38,540	111	153	382	339
TIC844_7 /NO:24	129149,84	1139	5,050	-38,539	111	153	381	340
TIC844_8 /NO:26	129102,82	1139	5,026	-39,539	110	153	382	339
Cry1Da1/ NO:28	132481,87	1165	5,087	-39,319	113	156	388	347
Cry1Da1_ 2.nno/NO :30	132552,95	1166	5,087	-39,319	113	156	389	347
Cry1Da1_ 3.nno/NO :32	132476,85	1166	5,087	-39,318	113	156	389	347
Cry1Da1_ 4.nno/NO :34	132622,06	1166	5,112	-38,319	114	156	389	346
Cry1Da1_ 5.nno/NO :36	132519,88	1166	5,112	-38,318	114	156	388	347
Cry1Da1_ 6.nno/NO :38	132501,90	1166	5,112	-39,319	114	156	388	346
Cry1Da1_ 7.nno/NO :40	132472,86	1166	5,087	-39,318	113	156	389	346
TIC844_9 .nno/NO: 42	129253,99	1140	5,026	-39,540	110	153	383	340
TIC844_1 1.nno/NO :44	129173,90	1140	5,026	-39,539	110	153	383	339

Фрагменты сконструированных инсектицидных белков, описанных в настоящем документе, могут быть укороченными формами, в которых одна или несколько аминокислот удаляются с N-конца, С-конца, середины белка, или их комбинаций без потери ингибирующей активности в отношении насекомых. Эти фрагменты должны сохранять ингибирующую активность родительского инсектицидного белка в отношении насекомых.

Белки, которые имеют сходство со сконструированными инсектицидными белками, могут быть идентифицированы путем сравнения друг с другом с использованием различных компьютерных алгоритмов, известных в данной области техники. Например, идентичность аминокислотных последовательностей белков, связанных со сконструированными белками, может быть проанализирована с использованием выравнивания Clustal W с использованием данных параметров по умолчанию: Матрица весовых оценок: *blosum*, штраф на внесение делеции в выравнивание: 10,0, штраф на продолжение делеции: 0,05, гидрофильные делеции: Вкл., гидрофильные остатки: *GPSNDQERK*, штраф на остаткоспецифичные делеции: Вкл. (Thompson, et al (1994) *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680). Процент идентичности аминокислот далее рассчитывают в виде выражения 100% умноженных на (идентичности аминокислот/длина искомого белка). Другие алгоритмы выравнивания также доступны в данной области техники и обеспечивают результаты, аналогичные тем, которые получены с использованием выравнивания Clustal W.

Как описано далее в примерах данной заявки, синтетические или искусственные последовательности, кодирующие каркасные белки и сконструированные инсектицидные белки, были разработаны для применения в растениях. Иллюстративные синтетические нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для применения у растений, изложены в SEQ ID NO:27 (*Cry1Da1.nno*), SEQ ID NO:29 (*Cry1Da1_2.nno*), SEQ ID NO:31 (*Cry1Da1_3.nno*), SEQ ID NO:33 (*Cry1Da1_4.nno*), SEQ ID NO:35 (*Cry1Da1_5.nno*), SEQ ID NO:37 (*Cry1Da1_6.nno*), SEQ ID NO:39 (*Cry1Da1_7.nno*), SEQ ID NO:41 (*TIC844_9.nno*) и SEQ ID NO:43 (*TIC844_11.nno*).

Экспрессионные кассеты и векторы, содержащие эти синтетические или искусственные нуклеотидные последовательности, конструировали и вводили в клетки растений кукурузы, хлопчатника и сои в соответствии со способами и методиками трансформации, известными в данной области техники. Трансформированные клетки регенерировали в трансформированные растения, которые, как было замечено, экспрессировали сконструированный инсектицидный белок или каркасный белок. Для проверки пестицидной активности биотесты проводили в присутствии личинок чешуекрылых-вредителей с использованием высечек из листьев растений, полученных от трансформированных растений.

Рассматриваются композиции молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют сконструированные инсектицидные белки. Например, сконструированный инсектицидный белок может быть экспрессирован конструктами рекомбинантной ДНК, в которых полинуклеотидная молекула с ОРС (открытой рамкой считывания), кодирующая сконструированный инсектицидный белок, функционально связана с элементами генетической экспрессии, такими как промотор и любой другой регуляторный элемент, необходимый для экспрессии в системе, для которой предназначен данный конструкт. Неограничивающие примеры включают растительный функциональный промотор, функционально связанный с кодирующими последовательностями синтетических инсектицидных белков, для экспрессии сконструированного инсектицидного белка в растениях, или *Bt*-функциональным промотор, функционально связанный с кодирующими последовательностями синтетических инсектицидных белков, для экспрессии белка в бактерии *Bt* или других видах рода *Bacillus*. Другие элементы могут быть функционально связаны со сконструированными кодирующими последовательностями инсектицидного белка, включая, но не ограничиваясь ими, энхансеры, интроны, нетранслируемые лидеры, кодированные белковые иммобилизационные метки (гистидиновые метки), транслокационные пептиды (т.е. плазмидные транзитные пептиды, сигнальные пептиды) полипептидные последовательности для посттрансляционных модифицирующих ферментов, сайты связывания рибосом и сайты-мишени РНКи. Приведенные в настоящем документе иллюстративные молекулы рекомбинантного полинуклеотида включают, но не ограничиваются ими, гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, таким как SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39 b SEQ ID NO:43, который кодирует полипептид или белок, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4 (*Cry1Da1_3*), SEQ ID NO:6 (*Cry1Da1_4*), SEQ ID NO:8 (*Cry1Da1_5*), SEQ ID NO:10 (*Cry1Da1_6*), SEQ ID NO:12 (*Cry1Da1_7*), SEQ ID NO:16 (*TIC844_2*), SEQ ID NO:18 (*TIC844_4*), SEQ ID NO:20 (*TIC844_5*), SEQ ID NO:22 (*TIC844_6*), SEQ ID NO:24 (*TIC844_7*), SEQ ID NO:26 (*TIC844_8*), SEQ ID NO:32 (*Cry1Da1_3.nno*), SEQ ID NO:34 (*Cry1Da1_4.nno*), SEQ ID NO:36 (*Cry1Da1_5.nno*), SEQ ID NO:38 (*Cry1Da1_6.nno*), SEQ ID NO:40 (*Cry1Da1_7.nno*) и SEQ ID NO:44 (*TIC844_11.nno*). Гетерологичный промотор также может быть функционально связан с синтетическими кодирующими последовательностями ДНК, кодирующими нацеленный на плазмиду сконструированный инсектицидный белок и нецелевой сконструированный инсектицидный белок. Предполагается, что кодоны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированный инсектицидный белок, описанный в настоящем документе, могут быть замещены синонимичными кодонами (известными в данном уровне техники как молчащая замена).

Рекомбинантная молекула ДНК или конструктор, содержащие сконструированную инсектицидную кодирующую белок последовательность, может дополнительно содержать область ДНК, которая кодирует один или более токсичных агентов, которые могут быть сконфигурированы для одновременной экспрессии или коэкспрессии с последовательностью ДНК, кодирующей сконструированный инсектицидный белок, белок, отличный от сконструированного инсектицидного белка, молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых или вспомогательный белок. Вспомогательные белки включают, но не ограничиваются ими, кофакторы, ферменты, партнеры по связыванию или другие агенты, которые действуют, с целью повышения эффективности агента, оказывающего ингибирующее воздействие на насекомое, например, путем облегчения его экспрессии, влияния на его стабильность в растениях, оптимизации свободной энергии для олигомеризации, увеличивая его токсичность и увеличивая спектра его активности. Вспомогательный белок может облегчать захват одного или более агентов, обладающих ингибирующим воздействием на насекомых, например, или усиливать токсический эффект токсичного агента.

Рекомбинантную молекулу ДНК или конструктор можно сформировать так, чтобы все белки или молекулы дцРНК экспрессировались от одного промотора, или каждый белок, или молекула дцРНК находилась под контролем отдельного промотора, или некоторой их комбинации. Белки согласно данному изобретению могут быть экспрессированы системой множественной экспрессии генов, в которой сконструированный инсектицидный белок экспрессируется из общего нуклеотидного сегмента, который также содержит другие открытые рамки считывания и промоторы, в зависимости от выбранного типа системы экспрессии. Например, бактериальная система множественной экспрессии генов может использовать единственный промотор для управления экспрессией многократно связанных/тандемных открытых рамок считывания из одного оперона (т.е., полицистронной экспрессии). В другом примере растительная система множественной экспрессии генов может использовать многократно несвязанные экспрессионные кассеты, каждая из которых экспрессирует другой белок или другой токсичный агент, такой как одна или более молекул дцРНК.

Рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты или рекомбинантные конструкторы ДНК, содержащие сконструированную кодирующую последовательность инсектицидного белка, могут быть доставлены в клетки-хозяева при помощи векторов, например, плазмидного, бакуловирусного, синтетической хромосомы, вирионного, космидного, фагмидного, фагового или вирусного вектора. Такие векторы могут быть использованы для достижения стабильной или кратковременной экспрессии сконструированной кодирующей последовательности инсектицидного белка в клетке-хозяине или последующей экспрессии кодируемого полипептида. Экзогенный рекомбинантный полинуклеотид или рекомбинантный конструктор ДНК, которые содержат сконструированную инсектицидную последовательность, кодирующую последовательность белка, и которые вводят в клетку-хозяина, упоминаются в настоящем документе как "трансген".

В настоящем документе предложены трансгенные бактерии, трансгенные клетки растений, трансгенные растения и трансгенные части растений, которые содержат полинуклеотид, кодирующий любой один или более инсектицидных белков. Термин "бактериальная клетка" или "бактерия" может включать, но не ограничивается ими, клетку видов родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* или *Rhizobium*. Термин "клетка растения" или "растение" может включать, но не ограничивается ими, клетку двудольного растения или клетку однодольного растения. Рассматриваемые растения и клетки растений включают, но не ограничиваются ими, люцерну, банан, ячмень, бобы, брокколи, капусту, капусту декоративную, морковь, маниок, клещевину, капусту цветную, сельдерей, нут, капусту пекинскую, цитрусовые, кокосовый орех, кофе, кукурузу, клевер, хлопчатник, тыквенные, огурец, ель Дугласа, баклажан, эвкалипт, лен, чеснок, виноград, хмель, лук-порей, салат латук, сосну Лоблолли, просо, дыни, орех, овес, маслину, лук, декоративные растения, пальму, пастбищную траву, горох, арахис, перец, голубиный горох, сосну, картофель, тополь, тыкву, сосну лучистую, редис, рапс, рис, корневищные злаки, рожь, сафлор, кустарниковые розы, сорго, сосну южную, сою, шпинат, тыкву гигантскую, клубнику, сахарную свеклу, сахарный тростник, подсолнечник, кукурузу сахарную, ликвидамбар смолоносный, сладкий картофель, просо, чай, табак, помидор, тритикале, дерновую траву, арбуз и клетку или растение пшеницы. В некоторых вариантах реализации изобретения представлены трансгенные растения и трансгенные части растений, регенерированные из трансгенной клетки растения. В некоторых вариантах реализации изобретения трансгенные растения могут быть получены из трансгенного семени, путем черенкования, отщипывания, измельчения или иным образом разъединения части с растением. В некоторых вариантах реализации изобретения часть растения может представлять собой семя, коробочку, лист, цветок, стебель, корень или любую их часть или нерегенерируемую часть трансгенной части растения. Используемый в данном контексте термин "нерегенерируемая" часть трансгенной части растения представляет собой часть, из которой не может быть индуцировано образование целого растения, или из которой не может быть индуцировано образование целого растения, способного к половому и/или вегетативному размножению. В некоторых вариантах реализации изобретения нерегенерируемая часть растения представляет собой часть трансгенного семени, коробочки, листа, цветка, стебля или корня.

Предложены способы получения трансгенных растений, которые содержат чешуекрыло ингиби-

рующие количества сконструированных инсектицидных белков. Такие растения могут быть получены путем введения полинуклеотида, который кодирует сконструированные инсектицидные белки, предложенные в настоящей заявке, в растительную клетку и отбора растения (полученного из указанной растительной клетки), которое экспрессирует инсектицидно- или чешуекрыло ингибирующее количество сконструированного белка. Растения могут быть получены из клеток растений путем регенерации или методик трансформации семян, пыльцы или меристемы. Способы трансформации растений известны в данной области техники.

Растения, экспрессирующие сконструированные инсектицидные белки, можно скрещивать путем селекции с трансгенными трансформантами, экспрессирующими другие инсектицидные белки и/или экспрессирующими другие трансгенные признаки, такие как другие признаки борьбы с насекомыми, гены устойчивости к гербицидам, гены, дающие признаки урожайности или устойчивости к стрессу, и т.п., или данные черты могут быть объединены в один вектор, так чтобы все признаки были связаны между собой.

Обработанные растительные продукты, содержащие обнаруживаемое количество сконструированного инсектицидного белка, сегмент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомого или его фрагмент, или любую отличительную его часть, также описаны в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации изобретения обработанный продукт выбран из группы, состоящей из частей растения, биомассы растения, масла, муки грубого помола, сахара, корма для животных, муки, хлопьев, отрубей, волокна, шелухи, обработанного семени и семени. В некоторых вариантах реализации изобретения, обработанный продукт является нерегенерируемым. Растительный продукт может содержать товарный или другие коммерческие продукты, полученные из трансгенного растения или трансгенной части растения, причем товарный или другие продукты могут быть отслежены с помощью коммерческой деятельности путем обнаружения нуклеотидных сегментов или экспрессированной РНК или белка, которые кодируют или содержат отличительные части сконструированного инсектицидного белка.

Способы борьбы с насекомыми, в частности поражение видами отряда Чешуекрылые, культурных растений, со сконструированными инсектицидными белками, также описаны в настоящей заявке. Такие способы могут включать выращивание растений, содержащих инсектицидно- или чешуекрыло-ингибирующее количество сконструированного инсектицидного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения такие способы могут дополнительно включать одно или более из следующего: (i) применение любой композиции, содержащей или кодирующей сконструированный инсектицидный белок, к растению или семени, что приводит к образованию растения; и (ii) трансформацию растения или клетки растения, что приводит к образованию растения с полинуклеотидом, кодирующим сконструированный инсектицидный белок. В общем, предполагается, что сконструированный инсектицидный белок может быть обеспечен в композиции, обеспечен, в микроорганизме, обеспечен, в трансгенном растении для придания ингибирующей активности в отношении насекомых отряда Чешуекрылые.

В некоторых вариантах реализации изобретения, сконструированный инсектицидный белок является инсектицидно активным ингредиентом композиции, обладающей ингибирующей активностью в отношении насекомых, полученной путем культивирования рекомбинантной *Bacillus* или любой другой рекомбинантной бактериальной клетки, трансформированной, для экспрессии сконструированного инсектицидного белка в условиях, пригодных для экспрессии. Такая композиция может быть получена с помощью высушивания, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, осаждения или концентрации культуры таких рекомбинантных клеток, экспрессирующих/продуцирующих сконструированный инсектицидный белок. Такой процесс может привести к образованию экстракта бактериальных клеток, суспензии клеток, клеточного гомогената, клеточного лизата, клеточного супернатанта, клеточного фильтрата или осаждению клеток *Bacillus* или другого энтомопатогена. Получив сконструированный инсектицидный белок, таким образом, создают композицию, которая содержит сконструированный инсектицидный белок, может содержать бактериальные клетки, бактериальные споры, а также параспоральные тельца и может поставляться для различных применений, включая продукты-спреи, обладающие ингибирующей активностью в отношении сельскохозяйственные насекомых или препараты кормовой биомассы, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых в кормовых биотестах.

В одном варианте реализации изобретения, для того, чтобы уменьшить вероятность развития устойчивости, композиция или трансгенное растение, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащие сконструированный инсектицидный белок могут дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный токсичный агент, который проявляет ингибирующей активностью в отношении одних и тех же видов чешуекрылых насекомых, но который отличается от сконструированного инсектицидного белка. Возможные дополнительные токсичные агенты для такой композиции включают молекулы белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых и молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых. Одним из примеров использования таких рибонуклеотидных последовательностей для борьбы с насекомыми-вредителями описаны в Baum, et al. (Патентная публикация США 2006/0021087 A1). Такой дополнительный полипептид(ы) для борьбы с чешуекрылыми насекомыми-вредителями может быть выбран из группы, состоящей

из белка, проявляющего ингибирующую активность в отношении насекомых, такого как, но не ограничиваясь ими, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (патентная публикация США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), Cry1D, Cry1E, Cry1F и химеры Cry1A/F (патент США № 7070982, 6962705 и 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (патент США № 7064249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, VIP3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, и AXMI-045 (патентная публикация США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (патентная публикация США 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (патентная публикация США 2013-0104259 A1), AXMI-134 (патентная публикация США 2013-0167264 A1), AXMI-150 (патентная публикация США 2010-0160231 A1), AXMI-184 (патентная публикация США 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (патентная публикация США 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (патентная публикация США 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (патентная публикация США 2014-0196175 A1), AXMI-238 (патентная публикация США 2014-0033363 A1), AXMI-270 (патентная публикация США 2014-0223598 A1), AXMI-345 (патентная публикация США 2014-0373195 A1), DIG-3 (патентная публикация США 2013-0219570 A1), DIG-5 (патентная публикация США 2010-0317569 A1), DIG-11 (патентная публикация США 2010-0319093 A1), AfIP-1A и его производные (патентная публикация США 2014-0033361 A1), AfIP-1B и его производные (патентная публикация США 2014-0033361 A1), PIP-1A/PIIP-1B (патентная публикация США 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (патентная публикация США 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (патентная публикация США 2014-0007292 A1), Pput_1063 (патентная публикация США 2014-0007292 A1), Pput_1064 (патентная публикация США 2014-0007292 A1), GS-135 и его производные (патентная публикация США 2012-0233726 A1), GS153 и его производные (патентная публикация США 2012-0192310 A1), GS154 и его производные (патентная публикация США 2012-0192310 A1), GS155 и его производные (патентная публикация США 2012-0192310 A1), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патентной публикации США 2012-0167259 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патентной публикации США 2012-0047606 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патентной публикации США 2011-0154536 A1, SEQ ID NO: 2, и ее производные, как описано в патентной публикации США 2011-0112013 A, SEQ ID NO: 2 и 4, и их производные, как описано в патентной публикации США 2010-0192256 A1, SEQ ID NO: 2, и ее производные, как описано в патентной публикации США 2010-0077507 A1, SEQ ID NO: 2, и ее производные, как описано в патентной публикации США 2010-0077508 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патентной публикации США 2009-0313721 A1, SEQ ID NO: 2 или 4, и их производные, как описано в патентной публикации США 2010-0269221 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патенте США № 7772465 (B2), CF161_0085 и его производные как описано в WO2014/008054 A2, токсичные белки, обладающие активностью в отношении чешуекрылых и их производные, как описано в патентных публикациях США US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1 и US2012-0117690 A1; SEQ ID NO: 2, и ее производные, как описано в US7510878 (B2), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патенте США № 7812129 (B1); и тому подобное.

В других вариантах реализации изобретения, композиция или трансгенное растение, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, могут дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный токсичный агент, который проявляет инсектицидную ингибирующую активность в отношении насекомых-вредителей, которые не восприимчивы к ингибирующей активности сконструированных инсектицидных белков согласно настоящему изобретению (например, жесткокрылых, полужесткокрылых и прямокрылых вредителей), для расширения полученного спектра ингибирующей активности в отношении насекомых.

Такой дополнительный токсичный агент для борьбы с жесткокрылыми насекомыми-вредителями может быть выбран из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, такого как, но не ограничиваясь этим, Cry3Bb (патент США 6501009), варианты Cry1C, варианты Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (патентная публикация США 2013-0167264 A1) AXMI-184 (патентная публикация США 2010-0004176 A1), AXMI-205 (патентная публикация США 2014-0298538 A1), axmi207 (патентная публикация США 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (патентная публикация США 20140245491 A1), AXMI-221z, AXMI-223z (патентная публикация США 2014-0196175 A1), AXMI-279 (патентная публикация США 2014-0223599 A1), AXMI-R1 и их варианты (патентная публикация США 2010-0197592 A1), TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (патентная публикация США 2010-0319092 A1), eNIPs (публикация заявки на патент США № 2010/0017914), IP3, и его варианты (патентная публикация США 2012-0210462 A1) и ϕ -Hexatoxin-Hv1a (публикация заявки на патент США US2014-0366227 A1).

Такой дополнительный токсичный агент для борьбы с полужесткокрылыми вредителями может быть выбран из группы, состоящая из белков, обладающих активностью в отношении полужесткокрылых, таких как, но не ограничиваясь ими, TIC1415 (патентная публикация США 2013-0097735 A1), TIC807 (патент США № 8609936), TIC834 (патентная публикация США 2013-0269060 A1), AXMI-036 (патентная публикация США 2010-0137216 A1) и AXMI-171 (патентная публикация США 2013-0055469

A1). Дополнительные полипептиды для борьбы с жесткокрылыми, чешуекрылыми и полужесткокрылыми насекомыми-вредителями можно найти на сайте номенклатуры токсина *Bacillus thuringiensis* поддерживаемом Neil Crickmore (во интернете, по адресу btomenclature.info).

Кодирующие последовательности сконструированного инсектицидного белка и последовательности, имеющие значительный процент идентичности со сконструированными инсектицидными белками могут быть идентифицированы с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), термическая амплификация и гибридизация. Например, сконструированные инсектицидные белки могут быть использованы для получения антител, которые специфически связываются с родственными белками, и могут быть использованы для скрининга и поиска других тесно связанных белков.

Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие сконструированные инсектицидные белки, могут быть использованы в качестве зондов и праймеров для скрининга с целью выявления других представителей класса с использованием методов термического цикла или изотермической амплификации и гибридизации. Например, олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 3 могут быть использованы, для определения наличия или отсутствия сконструированного инсектицидного трансгена в образце дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученном из товарного продукта. С учетом чувствительности некоторых способов обнаружения нуклеиновых кислот, которые используют олигонуклеотиды, предполагается, что олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 3 могут быть использованы для обнаружения соответствующего сконструированную инсектицидного белка в товарных продуктах, полученных из объединенных источников, где только часть товарного продукта, получена из трансгенного растения, содержащего SEQ ID NO: 3.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующих примеров и формулы изобретения.

Примеры

Ввиду вышеизложенного специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны изменения в конкретных аспектах, которые раскрыты и все будет получен подобный или аналогичный результат, не отходя от сущности и объема изобретения. Таким образом, конкретные структурные и функциональные детали, раскрытые в настоящем документе, не следует интерпретировать как ограничение. Следует понимать, что полное раскрытие каждой из указанных выше публикаций включено в описание настоящей заявки.

Пример 1. Разработка модифицированных тестовых белков и подготовка образцов для биологического анализа на насекомых.

Данный пример иллюстрирует способы, принятые для определения соответствующих аминокислотных остатков в каркасных белках, для модификации, для создания модифицированных тестовых белков, а также клонирование и экспрессию полученных модифицированных тестовых белков.

Некоторые методики молекулярной инженерии были использованы в многоуровневом подходе для конструирования улучшенных вариантов Cry1Da1, имеющих улучшенный спектр ингибирующей активности в отношении чешуекрылых и/или улучшенную ингибирующую активность в отношении чешуекрылых по сравнению с каркасными белками Cry1Da1 и TIC844 (гомолог Cry1Da1). Первый тур, или начальный этап конструирования, в первую очередь основан на гипотезах. Вторые и третьи туры были статистически управляемыми этапами конструирования. Например, во втором туре конструирования, статистически безвредные мутации были комбинированы с предполагаемыми полезными мутациями для получения двойных мутаций, которые удовлетворяли определенным статистическим критериям. В третьем туре конструирования, все данные из предыдущих испытаний были проанализированы с помощью нескольких статистических методов. Только мутации, продемонстрировавшие статистически значимое улучшение в более чем одном статистическом методе, были выбраны для окончательного пула мутаций. Варианты, разработанные в данном туре, содержали одну или две положительные мутации из вариантов, ранее подтвержденных как положительные. Таким образом, конструирование третьего тура существенно обогащало активные варианты по сравнению с первым и вторым туром. Как показано в последующих Примерах, использование трехтуровой стратегии конструирования определяет как одиночные, так и синергичные мутации, которые обеспечили значительное улучшение активности против CEW для некоторых улучшенных вариантов по отношению к каркасным TIC844 и Cry1Da1.

Способы, которые были использованы для создания модифицированных тестовых белков включают, но не ограничены ими, полуслучайные модификации, направленные модификации отклонений в выравнивании TIC844/Cry1Da1 с другими нативными белками *Bacillus Thuringensis* (Bt), и структурно/функциональное конструирование. Примеры используемых методик молекулярной инженерии включают следующие.

Связывание рецептора. Восприимчивость чешуекрылых насекомых-вредителей, в частности, совка кукурузной (CEW, *Helicoverpa zea*) к улучшенным вариантам Cry1Da1/TIC844 может быть отнесена к разным целевым кишечным рецепторам. Подходы, которые были использованы для улучшения связывания с рецепторами в кишечнике, тем самым увеличивая токсичность, включают: (1) подвергание мутации каждой позиции в апикальных петлях домена II по всем аминокислотным типам; и (2) замену всех

возможных комбинаций апикальных петель домена II на те же от других гомологов Cry1Da1 (например, Cry1Db1, Cry1Dc1) и CEW-активных трехдоменных токсинов (например, Cry1Bb1, Cry1Ja1 и Cry2Ab2).

Подходы, основанные на выравнивании. Выравнивание Cry1Da1 с другими гомологами (например, Cry1Db1 и Cry1Dc1) было использовано для идентификации областей изменчивости. В результате выравнивания были идентифицированы сто пятьдесят (150) позиций и двести девяносто пять (295) уникальных единичных мутаций. Эти позиции были расположены во всех трех доменах. Позиции в границах четырех (4) аминокислот друг от друга, были сгруппированы вместе. Только мутации из одинаковых исходных последовательностей были назначены для каждой группы позиций, с образованием ста тридцати двух (132) уникальных вариантов.

Подходы поверхностного мутагенеза. Полинуклеотиды, кодирующие поверхностные позиции в доменах II и III каркасных белков, были подвергнуты мутагенезу при сканировании. В позициях каркасного белка, где не присутствовал аланин, аминокислотные остатки были заменены на аланин. Аргининовые мутации в дополнении к аланиновым были введены в поверхностных положениях, в которых нативные остатки представляли собой лизин. Рациональность мутационных замен лизина на аргинин была основана на наблюдении, что токсины, обладающие активностью в отношении чешуекрылых, как правило, имеют очень мало лизина и много аргинина и, таким образом, была выдвинута гипотеза о том, что изменение в поверхностных положениях лизина в доменах II и III на аргинин может увеличить активность модифицированного тестового белка в отношении чешуекрылых.

Изменение протеолитических событий. Существует гипотеза, что протеолитический процесс является важным аспектом деятельности трехдоменных токсинов в средней кишке чешуекрылых насекомых. Для тестирования этого было создано несколько наборов мутаций способных изменять любое протеолитическое расщепление. Потенциальные сайты расщепления расположены на N-конце и между доменом III и протоксином. Мутационные позиции включают предсказанные области петли от N-конца к началу спирали 4, и с C-конца домена III до ~40 аминокислот в протоксине. Как правило, остатки глицина гипотетически содействовали протеолизу или посредством распознавания протеолитического сайта, или за счет увеличения гибкости белка, тем самым делая его более восприимчивым к протеолитическому расщеплению. Кроме того, трипсин и химо трипсин оба представляют собой протеазы, которые широко известны в качестве жизнеспособных протеаз в средней кишке чешуекрылых. Остатки лизина обеспечивают сайты узнавания для трипсина, а остатки тирозина обеспечивают сайты узнавания для химо трипсина. Таким образом, выбранные мутационные позиции в потенциальных сайтах расщепления подвергали глициновым, лизиновым или тирозиновым мутациям.

Потенциальные горячие точки мутаций от других CEW-активных токсинов. Была проанализирована данные активности и отсутствия активности против CEW для большого набора белков (включая химер, фрагменты и нативные последовательности).

Информация, полученная из статистического анализа этих данных, была использована для выявления потенциальных специфических мутаций или позиций для мутаций, которые, вероятно, увеличат CEW-активности конечных модифицированных тестовых белков.

Модифицированные тестовые белки, полученные в результате молекулярных методик инженерии, описанных выше, были клонированы с использованием способов, известные в данной области техники в рекомбинантный экспрессионный вектор плазмиды Bt уменьшали экспрессию специфического промотора спорообразование и трансформирован в некристаллообразующую клетку-хозяина Bt.

Пример 2. Тестирование модифицированных тестовых белков в кормовых биотестах против чешуекрылых вредителей.

Данный пример иллюстрирует тестирование модифицированных тестовых белков, созданных путем экспериментов конструирования, описанных в примере 1.

Путем экспериментов конструирования, описанных в примере 1, были произведены около двух тысяч пятисот (2500) рекомбинантных штаммов Bt, экспрессирующих более двух тысяч трехсот (2300) различных модифицированных тестовых белков. Эти модифицированные тестовые белки экспрессировались Bt и испытывались на токсичность в отношении различных видов отряда Lepidoptera. Эксперименты кормления были проведены на новорожденных личинках (<24 ч после вылупления) различных видов чешуекрылых, включая совку кукурузную (CEW, *Helicoverpa zea*) и кукурузную листовую совку (FAW, *Spodoptera frugiperda*). Яйца насекомого для CEW-тестирования были получены из двух различных лабораторных колоний: Benson Research, Карлайл штат Пенсильвания и Monsanto Company, Юнион-Сити, штат Теннесси. Все экспрессированные модифицированные тестовые белки были протестированы против CEW, и некоторые из этих модифицированных тестовых белков, демонстрирующих повышенную активность против CEW по сравнению с их родительскими каркасными белками, были протестированы против FAW, в дополнении к выполнению дополнительного биотеста для подтверждения активности против CEW.

Различные протоколы для биотестов и оценки смертности и задержке роста насекомых известны в данной области техники. Были использованы вариации способов, таких, как те, которые описаны в публикации патентной заявки PCT № WO 2012/139004 и в патенте США № 7927598.

Пример 3. Модифицированные тестовые белки проявляющие улучшенную активность против

CEW.

Данный пример иллюстрирует открытие расширенного ингибирующего спектра в отношении чешуекрылых и/или улучшенной или увеличенной ингибирующей активности в отношении чешуекрылых для некоторых из модифицированных тестовых белков по сравнению с активностью каркасных белков TIC844 или Cry1Da1 в нескольких этапах тестирования.

Модифицированные тестовые белки, созданные при помощи экспериментов конструирования, описанных в примере 1, и испытанных в биотесте насекомых, как описано в примере 2, были испытаны в повторяющихся этапах, в которых сравнивали активность в отношении видов чешуекрылых модифицированных тестовых белков с их соответствующими родительскими каркасными белками (т.е., TIC844 или Cry1Da1). На первом этапе триста семьдесят (370) различных модифицированных тестовых белков продемонстрировали повышенную токсичность в отношении CEW по сравнению с СМР TIC844 или Cry1Da1 в кормовом биотесте. В каждом из этих кормовых биотестов, одинаковые количества белка (или модифицированный тестовый белок или каркасный белок) были предоставлены CEW в контролируемых условиях анализа с однократной дозой. Активность модифицированных тестовых белков и каркасных белков определяли путем измерения и сравнения наблюдаемой смертности и задержки роста каждого из биотестов модифицированной тестовых белков к наблюдаемой смертности и задержке роста биотестов родительских каркасных белков.

Из трех сто семидесяти (370) модифицированных тестовых белков, которые продемонстрировали повышенную токсичность в отношении CEW по сравнению с каркасными белками в однодозных тестах, около сто восемьдесят (180) из них были дополнительно испытаны в FAW-биотестах, чтобы определить, поддерживали или проявляли эти модифицированные тестовые белки повышенную активность по отношению к FAW по сравнению с их родительскими каркасными белками. От около сорока (40) до пятидесяти (50) из этих модифицированных тестовых белков проявляли сходную или более высокую активность в отношении FAW по сравнению с их родительскими каркасными белками. Эти дополнительно исследованные модифицированные тестовые белки были также испытаны в дополнительных CEW-биотестах, для подтверждения активности в отношении CEW. В результате этих этапов отбора и тестирования модифицированных тестовых белков, которые продемонстрировали улучшенную активность в отношении CEW при сохранении или улучшении активности в отношении FAW был получен окончательный список улучшенных вариантов (упоминаемый в настоящем документе как "сконструированные инсектицидные белки"). В Таблице 2 приводятся эти сконструированные инсектицидные белки и аминокислотные мутации в каждом сконструированном инсектицидном белке. В табл. 2 также представлена активность каркасных и сконструированных инсектицидных белков в отношении CEW и FAW (инсектицидная активность показана в значении LC_{50} (концентрация токсина, необходимая, для уничтожения 50% популяции насекомых в течение заданной длительности воздействия. Чем ниже значение LC_{50} , тем выше токсичность) и значении MIC_{50} (концентрация, необходимая для ингибирования личинки определенной возрастной стадии 50% личинок в течение фиксированной длительности воздействия). В данной таблице показано, что сконструированные инсектицидные белки обладают улучшенной активностью в отношении CEW, при сохранении или улучшении активности в отношении FAW.

Таблица 2. Аминокислотные мутации и данные активности для каркасных белков и сконструированных инсектицидных белков

Белок (Название/SEQ ID NO.)	Аминокислотные Мутации*	LC ₅₀ (мкг/см ²) по отношению к СЕУ колонии Benzop в подготовительном	MIC ₅₀ (мкг/см ²) по отношению к СЕУ Колония Benzop в
		спорово- кристаллическом биотесте	подготовительном спорово- кристаллическом биотесте
Cry1Da1 /NO: 2, 28	Отсутствует (каркасный белок)	н/д **	~ 3,0
Cry1Da1 _3/NO:4	Cry1Da1+Y316S	н/д **	н/д **
Cry1Da1 _4/NO:6	Cry1Da1+S374R	н/д **	н/д **
Cry1Da1 _5/NO:8	Cry1Da1+Y316S_I368R	н/д **	н/д **
Cry1Da1 _6/ NO:10	Cry1Da1+S282K_Y316S_I368P	н/д **	н/д **
Cry1Da1 _7/ NO:12	Cry1Da1+S282V_Y316S_I368P	н/д **	н/д **
TIC844/ NO:14	Отсутствует (каркасный белок)	41,90	3,73
TIC844_ 2/NO:16	TIC844+Y316S_N375H_I432L	0,81	0,65
TIC844_ 4/NO:18	TIC844+Y316S	0,98	0,57й
TIC844_ 5/NO:20	TIC844+S282K_Y316S_I368P	0,32	0,33
TIC844_ 6/NO:22	TIC844+S374R	4,09	1,39
TIC844_ 7/NO:24	TIC844+Y316S_I368R	0,93	0,61
TIC844 8/NO:26	TIC844+S282V_Y316S_I368P	0,221	,064

* Аминокислотные мутации идентифицированы с использованием стандартного кода IUPAC аминокислот. См., IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984). Первая аббревиатура аминокислотной последовательности указывает на исходную аминокислоту в данном каркасном белке, число указывает положение аминокислоты, а вторая аббревиатура аминокислотной последовательности, указывает на аминокислоту, расположенную в этом положении в усовершенствованном варианте белка.

** Основной токсин Cry1Da1 идентичен основному токсину TIC844.

Далее демонстрируется улучшенный ингибирующий спектр чешуекрылых и улучшенная ингибирующая активностью в отношении чешуекрылых для сконструированных инсектицидных белков, летальность сконструированного инсектицидного белка TIC844_8 относительно его родительского каркасного белка представлена на чертеже. На гистограмме показано значения MIC₅₀ TIC844_8 по сравнению с

каркасом белка TIC844 для двух различных колоний CEW, Union City и Benzon. Результаты биотестов, изображенные на чертеже, были рассчитаны из биотестов препаратов, очищенных градиентом сахарозы. Эти вторичные биотесты были проведены с препаратами белков, очищенными градиентом сахарозы вместо спорово-кристаллических препаратов белков для того, чтобы гарантировать, что улучшенная активность TIC844_8 сохраняется при более интенсивной очистке. Кроме того, колонию Union City тестировали для подтверждения повышенной активности, наблюдаемой в колонии Benzon. Как показано на чертеже, мутации в трех остатках TIC844_8 (S282V_Y316S_I368P), придавали 8-кратное улучшение летальности CEW, по сравнению с TIC844, для колонии Union City и 50-кратное улучшение летальности CEW, по сравнению с TIC844, для колонии Benzon.

Далее демонстрируется улучшенный ингибирующий спектр в отношении чешуекрылых и улучшенную ингибирующую активность в отношении чешуекрылых для сконструированных инсектицидных белков, профили активности против насекомых для TIC844 и TIC844_8 из кормовых биотестов, проводимых в отношении широкого спектра видов насекомых-чешуекрылых, приведены в табл. 3. Насекомые, в отношении которых проводились испытания в биотестах из табл. 3, включают совку ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совку кукурузную (CEW, *Helicoverpa zea*), совку кукурузную листовую (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совку южную (SAW, *Spodoptera eridania*), совку ни (CLW, *Trichoplusia ni*), огневку кукурузную (ECB, *Ostrinia nubilalis*), юго-западного кукурузного мотылька (SWC, *Diatraea grandiosella*), совку табачную (TBW, *Heliothis virescens*), гусеницу бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), совку соевую (SBL, *Chrysodeixis includes*) и огневку сахарного тростника (SCB, *Diatraea saccharalis*). В данной табл. 3 представлен улучшенный ингибирующий спектр TIC844_8 в отношении чешуекрылых по сравнению с родительским каркасным белком TIC844, в частности, с улучшенной активностью против CEW и VBC.

Таблица 3. Спектр активности для TIC844 и TIC844_8 в отношении насекомых

SEQ ID NO.	Белок	BCW	CEW	FAW	SAW	CLW	ECB	SWC	TBW	VBC	SBL	SCB
26	TIC844_8		*	*	*	*				*	*	*
14	TIC844			*	*	*					*	*

* Активен в отношении указанных видов насекомых.

Улучшенный ингибирующий спектр сконструированных инсектицидных белков в отношении чешуекрылых, далее продемонстрирован в таблице 4, в которой представлен профиль активности насекомых для некоторых модифицированных инсектицидных белков из исследований кормовых биотестов. Насекомые, в отношении которых проводились испытания в биотестах из таблицы 4, включают совку американскую (CBW, *Helicoverpa armigera*), совку азиатскую хлопковую (TCW, *Spodoptera litura*), совку малую (BAW, *Spodoptera exigua*), розового коробочного червя (PBW, *Pectinophora gossypiella*), совку розовую стеблевую (PSB, *Sesamia inferens*) и совку пятнистую (SBW, *Earias vitella*). Результаты, представленные в таблице 4, указывают на повышенный ингибирующий спектр в отношении чешуекрылых у перестроенных сконструированных инсектицидных белков (по сравнению с каркасным белком Cry1Da1) в частности, с улучшенной активностью против CBW, PBW (устойчивые к Cry1Ac), PBW (естественного происхождения) и SBW.

Таблица 4. Сравнение профилей инсектицидной активности для Cry1Da1 и сконструированных инсектицидных белков

SEQ ID NO.	Белок	CBW	TCW	BAW	PBW (Выращенный в лаборатории)	PBW (устойчивый к Cry1Ac)	PBW (естественного происхождения)	PSB	SBW
2	Cry1Da1		+	+	+	+	+	+	
12	Cry1Da1_7	+	+	+	+	+	+		+
18	TIC844_4	+	+	+	+	+			+
20	TIC844_5	+	+	+	+	+			+
24	TIC844_7	+	+	+	+	+			

+Активен в отношении указанных видов насекомых.

Пример 4. Синтез генов, кодирующих инсектицидные сконструированные белки и каркасные белки для экспрессии в растениях.

Данный пример иллюстрирует синтез полинуклеотидов, кодирующих сконструированные инсектицидные белки и каркасные белки для экспрессии в растениях.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие каркасные белки и сконструированные инсектицидные белки для экспрессии в растениях, были разработаны и синтезированы в соответствии со способами, описанными в патенте США № 5500365, избегая определенные неподходящие проблемные последовательности, таких как последовательности полиаденилирования растений, обогащенные АТТТА и А/Т, при сохранении аминокислотной последовательности исходного каркасного или сконструированного инсектицидного белка. Нуклеотидные последовательности этих генов, кодирующие сконструированные белки и каркасные белки для экспрессии в растениях, перечислены ниже в Таблице 5.

Таблица 5. Полинуклеотидных последовательностей, сконструированные для использования в растениях, кодирующие каркасные и сконструированные инсектицидные белки

Нуклеотидная SEQ ID NO.	БЕЛОК	ВАРИАНТ
27	Cry1Da1.nno	Отсутствует (каркасный белок)
29	Cry1Da1_2.nno	Cry1Da1+A2**
31	Cry1Da1_3.nno	Cry1Da1+Y316S+A2
33	Cry1Da1_4.nno	Cry1Da1+S374R+A2
35	Cry1Da1_5.nno	Cry1Da1+S374R+A2
37	Cry1Da1_6.nno	Cry1Da1+S282K_Y316S_I368P+A2
39	Cry1Da1_7.nno	Cry1Da1+S282V_Y316S_I368P+A2
41	TIC844_9.nno	TIC844+A2
43	TIC844_11.nno	TIC844+S282V_Y316S_I368P+A2

** Обозначение вариантов "A2" означает вставку остатка аланина в аминокислотное положение 2 по сравнению с нативной последовательностью для целей клонирования в экспрессионные векторы растений.

Пример 5. Экспрессионные кассеты для экспрессии модифицированных инсектицидных белков в растениях.

Данный пример иллюстрирует конструирование экспрессионных кассет, содержащих полинуклеотидные последовательности, сконструированные для использования в растениях, кодирующие каркасные и сконструированные инсектицидные белки.

Разнообразные растительные экспрессионные кассеты были сконструированы с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей каркасные и сконструированные инсектицидные белки, сконструированы для экспрессии в растениях, представлены в табл. 5. Такие экспрессионные кассеты могут быть использованы для временной экспрессии в протопластах растений или трансформации клеток растений. Типичные экспрессионные кассеты были сконструированы с учетом возможного размещения белка в клетке. Один набор экспрессионных кассет был разработан таким образом, чтобы обеспечить трансляцию белка и его расположение в цитозоле. Другой набор экспрессионных кассет был разработан для получения транзитного пептида, смежного с белковым токсином, для обеспечения ориентации на органеллы клетки, такие как хлоропласт или пластида. Все экспрессионные кассеты были сконструированы, чтобы начинаться на 5'-конце с промотора, который может состоять из нескольких промоторных элементов, энхансерных элементов или других экспрессионных элементов, известных специалистам в данной области техники, функционально связанных, для повышения экспрессии трансгена. За промоторной последовательностью, как правило, непрерывно следует одна или более лидерная последовательность на 3'-конце промотора. Интронная последовательность, как правило, расположена на 3'-конце лидерной последовательности, для улучшения экспрессии трансгена. Последовательность, кодирующая токсин или транзитный пептид, и последовательность, кодирующая токсин, как правило, расположена на 3'-конце функционально связанного промотора, лидера и интрона. Последовательность 3'-НТО, как правило, расположена, на 3'-конце кодирующей последовательности для облегчения терминации транскрипции и обеспечения последовательности, важной для полиаденилирования получаемого транскрипта. Все элементы, описанные выше, были функционально связаны между собой и расположены последовательно, часто с дополнительными последовательностями, используемыми для конструирования экспрессионной

кассеты.

Пример 6. Трансформационные векторы, содержащие экспрессионную кассету каркасного или сконструированного инсектицидного белка.

Данный пример иллюстрирует включение каркасных или сконструированных инсектицидных белков в ткани растений.

Способы получения трансгенного растения, экспрессирующего сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий каркасный белок или сконструированный инсектицидный белок может быть осуществлен с использованием вариации способов, хорошо известных в данной области техники. В общем, способ включает преобразование пригодной клетки-хозяина с сегментом ДНК, который содержит промотор, функционально связанный с кодирующим участком, кодирующим один или более модифицированных инсектицидных белков или каркасных белков. Такой кодирующий участок, как правило, функционально связан с участком терминирования транскрипции, причем промотор способен управлять транскрипцией кодирующего участка в клетке, и, следовательно, обеспечивает клетке способность продуцировать полипептид *in vivo*. Векторы, плазмиды, космиды, и сегменты ДНК, используемые в трансформации таких клеток, как правило, включают опероны гены или последовательности, полученные из генов, как нативные, так и полученные синтетически, в частности те, которые кодируют раскрытые сконструированные инсектицидные белки. Эти ДНК-конструкты могут дополнительно содержать структуры, такие как промоторы, энхансеры, полилинкеры или другие генные последовательности, которые могут регулировать деятельность конкретных искомым генов. Полученные трансгенные растения, части растений и клетки растений тестировали для определения экспрессии и биологической активности кодируемого белка.

Примеры способов, которые могут быть модифицированы для получения трансгенных растений, экспрессирующих белки, проявляющие активность в отношении чешуекрылых, включают описанные, например, белки Cry1A (патент США № 5880275), Cry1B (публикация заявки на патент США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), химеры Cry1A/F (патенты США № 7070982, 6962705 и 6713063), и белок Cry2Ab (патент США № 7064249).

Пример 7. Активность в отношении чешуекрылых сконструированного инсектицидного белка в стабильно трансформированной кукурузе.

Данный пример иллюстрирует ингибиторную активность, проявляемую сконструированными инсектицидными белками в отношении чешуекрылых-вредителей, экспрессированными растениями кукурузы и предложенными в виде корма для соответствующих насекомых-вредителей.

R0 трансгенные растения кукурузы, экспрессирующие белки Cry1Da1 и Cry1Da1_7.nno были получены с использованием векторов, содержащих экспрессионные кассеты, описанные в примере 6. F1 трансгенные растения кукурузы были выращены из семян, полученных путем опыления соцветий с зародышевой плазмой коммерческих нетрансформированных растений дикого типа пыльцой от R0 трансформантов.

Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биотесты с использованием дисков из листьев растений были проведены аналогично тем, которые описаны в патенте США № 8344207. Нетрансформированное растение использовали для получения ткани для негативного контроля. Оценивали множество объектов трансформации для каждого бинарного вектора, и результаты были сведены в таблицу.

Инсектицидная активность трансгенных растений кукурузы, экспрессирующих белки Cry1Da1 и Cry1Da1_7.nno в поколениях F1 и R0 приведена в табл. 6, в дополнении к инсектицидной активности трансгенных растений кукурузы, экспрессирующих белки Cry1Da1 и Cry1Da1_7.nno на стадии F1 в полевых условиях. В частности, в Таблице 6 представлен профиль активности в отношении чешуекрылых для Cry1Da1_7.nno по сравнению с родительским каркасным белком Cry1Da1 при тестировании против CEW, FAW и SWC. Как видно из Таблицы 6, в отличие от Cry1Da1, Cry1Da1_7.nno демонстрирует активность против обоих CEW и FAW в R0 и F1 биотестах и F1 полевых испытаниях.

Таблица 6. Профиль инсектицидной активности для Cry1Da1 и Cry1Da1_7.nno, экспрессированных в растениях кукурузы

Белок (SEQ ID NO.)	CEW			FAW			SWC		
	R0	F1	Поле	R0	F1	Поле	R0	F1	Поле
Cry1Da1 (28)	-	НТ	НТ	+	НТ	НТ	-	НТ	НТ
Cry1Da1_7.n no (40)	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых; НТ - не тестировали.

Пример 8. Активность в отношении чешуекрылых у модифицированных инсектицидных белков в стабильно трансформированном хлопчатника.

Данный пример иллюстрирует ингибиторную активность, проявляемую сконструированными инсектицидными белками в отношении чешуекрылых-вредителей, экспрессированными растениями хлопчатника и предложенными в виде корма для соответствующих насекомых-вредителей. Растения хлопчатника, экспрессирующие белки Cry1Da1_7.nno и TIC844_11.nno были получены с использованием векторов, содержащих экспрессионные кассеты, описанные в примере 6. Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Ткань листьев хлопчатника использовали в биотесте, описанном в примере 7, и испытывали против CBW, FAW, совки табачной (TBW, *Heliothis virescens*) и SBL. В табл. 7 представлена активность, наблюдаемая в отношении данных видов чешуекрылых в стабильно трансформированном поколении R₀ хлопчатника. Как видно из табл. 7, Cry1Da1_7.nno и TIC844_11.nno продемонстрировали активность в отношении двух или более видов чешуекрылых-вредителей в стабильно трансформированном поколении R₀ хлопчатника.

Таблица 7. Биотест профиля активности Cry1Da1_7.nno и TIC844_11.nno экспрессированных в поколении R₀ хлопчатника

Токсин	CBW	FAW	TBW	SBL
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	+
TIC844_11.nno (SEQ ID NO: 44)	+	+	-	+

+ Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых.

Выбранные объекты трансформации были использованы для получения R₁ растений. R₁ растения, экспрессирующие Cry1Da1_7.nno, анализировали на устойчивость к CBW, FAW и SBL. Ткани листа, бутона и коробочки использовали в биотестах, в дополнении к полевым испытаниям, проведенным в теплицах. В табл. 8 продемонстрирована активность, наблюдаемую в данных тестах. Как показано в табл. 8, Cry1Da1_7.nno продемонстрировал активность против CBW, FAW и SBL в биотестах и полевых испытаниях.

Таблица 8. Профиль инсектицидной активности Cry1Da1_7.nno экспрессированного в поколении R₁ хлопчатника

Токсин	CBW			FAW			SBL	Теплица	
	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	CBW	FAW
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых.

Пример 9. Активность в отношении чешуекрылых у модифицированных инсектицидных белков в стабильно трансформированной сое.

Данный пример иллюстрирует ингибиторную активность, проявляемую сконструированными инсектицидными белками в отношении чешуекрылых-вредителей, экспрессированными растениями сои и предложенными в виде корма для соответствующих насекомых-вредителей. Растения сои, экспрессирующие белки Cry1Da1_7.nno, TIC844_9.nno и TIC844_11.nno были получены с использованием векторов, содержащих экспрессионные кассеты, описанные в примере 6. Ткань листа собирали и использовали в биотесте, как описано в примере 7, или, в альтернативном варианте, лиофилизированную ткань использовали в рационе насекомых для биотестов. Биотест проводили в отношении различных видов чешуекрылых, в том числе SAW, SBL и совку кукурузную (SPW, *Helicoverpa zea*). В табл. 9 представлена активность, наблюдаемая в отношении данных чешуекрылых-вредителей в стабильно трансформированном поколении R₀ сои. Как видно из Таблицы 9, Cry1Da1_7.nno и TIC844_11.nno продемонстрировали активность в отношении SPW, SAW и SBL. TIC844_9.nno (TIC844 плюс дополнительный аланин для клонирования) не продемонстрировали активность против SPW.

Таблица 9. Биотест профиля активности Cry1Da1_7.nno, TIC844_9.nno и TIC844_11.nno экспрессированных в поколении R₀ сои

Токсин	SPW	SAW	SBL
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+
TIC844_11.nno (SEQ ID NO: 44)	+	+	+
TIC844_9.nno (SEQ ID NO: 42)	-	+	+

+ Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых.

Выбранные объекты трансформации были использованы для получения R₁ растений. R₁ растения, экспрессирующие Cry1Da1_7.nno, анализировали на устойчивость к SAW, SBL, SPW и гусенице бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatalis*). Ткань листа собирали с растений поколения R₁ и использовали в кормовом биотесте. В табл. 10 продемонстрирована активность, наблюдаемую в данных тестах. Как показано в табл. 10, Cry1Da1_7.nno продемонстрировал активность в отношении SPW, SAW и SBL.

Таблица 10. Биотест профиля активности Cry1Da1_7.nno, экспрессированного в поколении R₁ сои

Токсин	SPW	SAW	SBL	VBC
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	-

+Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых.

В табл. 11 представлены результаты полевых испытаний, проведенных в теплицах на стабильно трансформированных растениях сои поколения R₁, экспрессирующих Cry1Da1_7.nno. Виды, использованные для заражения растений в теплицах, включают совку черную (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), моль фасоловую (BSM, *Crociosema aporema*), совку южноамериканскую (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), пяденицу подсолнечниковую (SFL, *Rachiplusia* пи) и VBC. В Таблице 11 продемонстрирована активность, наблюдаемую в данных тестах. Как показано в табл. 11, Cry1Da1_7.nno продемонстрировал активность в отношении BLAW, SAPW и SFL.

Таблица 11. Профиль активности Cry1Da1_7.nno, экспрессированного в поколении R₁ сои,

протестированный в полевых испытаниях в теплице

Токсин	BLAW	BSM	SAPW	SFL	VBC
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	-	+	+	-

+ Активен в отношении видов насекомых; - не активен в отношении видов насекомых.

Все композиции и способы, описанные и заявленные в настоящем документе, могут быть проведены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиции настоящего изобретения были описаны с точки зрения вышеизложенных иллюстративных вариантов реализации, специалистам в данной области техники будет понятно, что варианты, изменения, модификации и перестройки могут быть применены к композиции, описанной в настоящем документе, без отступления от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно будет очевидно, что определенные агенты, которые схожи и химически, и физиологически, могут быть использованы вместо агентов, описанных в настоящем документе, достигая тех же или подобных результатов. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные специалистам в данной области техники, считаются не выходящими за пределы сущности, объема и концепции настоящего изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, отличающийся тем, что сконструированный инсектицидный белок проявляет ингибирующую активность против насекомых отряда Lepidoptera.
2. Сконструированный инсектицидный белок по п.1, отличающийся тем, что указанные насекомые отряда Lepidoptera выбраны из родов *Spodoptera* и *Helicoverpa*.
3. Сконструированный инсектицидный белок по п.2, в котором указанные насекомые родов *Spodoptera* и *Helicoverpa* выбраны из *Spodoptera frugiperda* и *Helicoverpa zea*.
4. Полинуклеотид, кодирующий сконструированный инсектицидный белок по п.1, функционально связанный с гетерологичным промотором.
5. Полинуклеотид, кодирующий сконструированный инсектицидный белок по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39.
6. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.5, выбранная из группы, состоящей из бактериальной клетки-хозяина и растительной клетки-хозяина.
7. Клетка-хозяин по п.6, отличающаяся тем, что выбрана из группы, состоящей из *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, и *Erwinia*.
8. Клетка-хозяин по п.6, отличающаяся тем, что растительная клетка-хозяин получена из растения, выбранного из группы, состоящей из однодольных и двудольных растений.
9. Композиция, содержащая сконструированный инсектицидный белок по п.1, проявляющая ингибирующую активность против насекомых отряда Lepidoptera.
10. Композиция по п.9, дополнительно содержащая по меньшей мере один другой агент, обладающий инсектицидной активностью, отличный от сконструированного инсектицидного белка по п.1, выбранный из группы, состоящей из инсектицидного белка, и молекулы дцРНК, обладающей инсектицидной активностью.
11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что по меньшей мере один другой агент, обладающий

инсектицидной активностью, проявляет активность в отношении одного или более насекомых отрядов Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Homoptera или Thysanoptera.

12. Семя, содержащее эффективное количество:

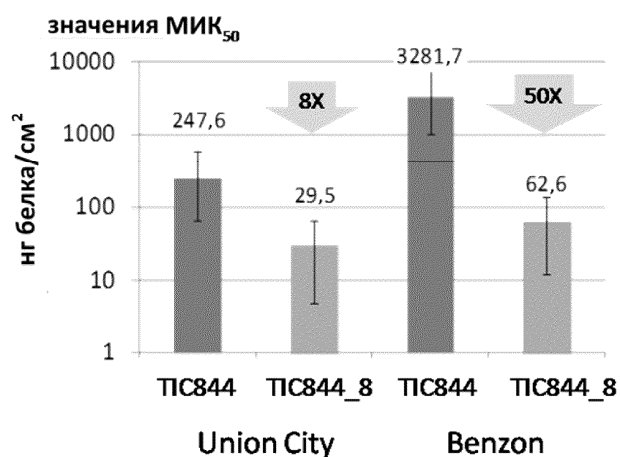
- a) сконструированного инсектицидного белка по п.1 или
- b) полинуклеотида по п.4.

13. Способ борьбы с насекомыми отряда Lepidoptera, включающий приведение в контакт указанных насекомых с эффективным количеством сконструированного инсектицидного белка по п.1.

14. Трансгенное растение или часть растения, содержащие сконструированный инсектицидный белок по п.1.

15. Способ получения семени, содержащего полинуклеотид, кодирующий сконструированный инсектицидный белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, включающий:

- a) получение по меньшей мере одного семени от трансгенного растения по п.14;
- b) посадку по меньшей мере одного семени, содержащего сконструированный инсектицидный белок по п.1;
- c) выращивание растений из указанных семян и
- d) сбор семени от указанных растений, причем указанное собранное семя содержит указанный полинуклеотид.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2