

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037469**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.31

(21) Номер заявки
201890589

(22) Дата подачи заявки
2016.08.25

(51) Int. Cl. *A01N 63/02* (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01)
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/32 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) НОВЫЕ БЕЛКИ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ИНГИБИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К НАСЕКОМЫМ

(31) 62/210,737

(32) 2015.08.27

(33) US

(43) 2018.07.31

(86) PCT/US2016/048714

(87) WO 2017/035364 2017.03.02

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

(72) Изобретатель:
Боуэн Дэвид Дж., Чай Кэтрин А., Сич Тодд А., Кесенейполли Ума Р., Лутке Дженнифер Л. (US)

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

(56) WO-A1-2012138703
US-B2-7364728

ZHANG et al.: "Cloning and Analysis of the First cry Gene from *Bacillus popilliae*," *Journal of Bacteriology*, 01 July 1997 (01.07.1997), Vol. 179, No. 13, Pgs. 4336-4341, entire document

US-A1-20080019914

YAMAMOTO et al.: "Chapter 2.2: Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests," *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, 2000, Pgs. 81-100, entire document

WO-A1-2015120276

(57) Описаны пестицидные белки, проявляющие токсическую активность против видов насекомых-вредителей отряда чешуекрылых, которые включают, но не ограничиваются ими, TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL. Предложены конструкции ДНК, которые содержат последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более описанных пестицидных белков. Предложены трансгенные растения, растительные клетки, семена и части растений, устойчивые к заражению чешуекрылыми, которые содержат последовательности рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующие пестицидные белки по данному изобретению. Также предложены способы обнаружения наличия последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот или белков по данному изобретению в биологическом образце и способы борьбы с видами насекомых-вредителей отряда чешуекрылых с применением любых пестицидных белков из TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL.

037469 B1

037469 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США №62/210,737, поданной 27 августа 2015 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Включение перечня последовательностей

Файл с именем "38-21_61627US0001SEQLISTING_ST25.txt", содержащий машиночитаемую форму перечня последовательностей, был создан 3-го августа 2016 г. Этот файл составляет 94,508 байт (измеренный в MS-Windows®), одновременно подан в электронной форме (с использованием системы регистрации EFS-Web Патентного ведомства США) и полностью включается в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Данное изобретение в целом относится к области белков, обладающих ингибиторной активностью в отношении насекомых. Раскрывается новый класс белков, проявляющих инсектицидную ингибирующую активность против сельскохозяйственных вредителей сельскохозяйственных культур и семян. В частности, описанный класс белков является инсектицидно активным в отношении вредителей сельскохозяйственных культур и семян, в частности видов чешуекрылых насекомых-вредителей. Предлагаются растения, части растений и семена, содержащие рекомбинантный полинуклеотидный конструкт, кодирующий один или более описанных белков токсина.

Уровень техники

Все большее значение приобретает повышение урожайности сельскохозяйственных культур, включая, среди прочего, кукурузу, сою, сахарный тростник, рис, пшеницу, овощи и хлопок. По прогнозам, в дополнение к растущей потребности в сельскохозяйственной продукции для обеспечения пищи, одежды и обеспечения энергией растущего населения, климатическим последствиям и давлению со стороны растущего населения на использование земли, отличной от сельскохозяйственной, уменьшается количество доступных пахотных земель для ведения сельского хозяйства. Данные факторы привели к неоптимистичным прогнозам продовольственной безопасности, особенно в условиях отсутствия значительных улучшений в области биотехнологии растений и агрономических приемов. В свете данных факторов, экологически устойчивые усовершенствования в области технологий, агротехники и борьбы с вредителями являются жизненно важными инструментами для расширения производства сельскохозяйственных культур на ограниченном количестве пахотных земель, доступных для ведения сельского хозяйства.

Насекомые, особенно насекомые в пределах отряда чешуекрылых и жесткокрылых, считаются основной причиной повреждения полевых культур, тем самым снижая урожайность культур в зараженных районах. Виды-вредители отряда чешуекрылых, которые отрицательно влияют на сельское хозяйство, включают, но без ограничений, африканскую совку (*Spodoptera exempta*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), американскую кукурузную совку (*Helicoverpa zea*), совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*), капустную моль (*Plutella xylostella*), мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), кукурузную листовую совку, устойчивую к Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), совку американскую (OWB, *Helicoverpa armigera*), южную совку (*Spodoptera eridania*), соевую совку (*Chrysodeixis includens*), совку пятнистую (*Earias vittella*), огневку кукурузную юго-западную (*Ditaaea grandiosella*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), табачную совку (*Spodoptera litura*), также известную как табачный озимый червь), совку бобовую западную (*Striacosta albicosta*) и совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*).

Исторически сложилось так, что интенсивное применение синтетических химических инсектицидов использовалось в качестве средства борьбы с вредителями в сельском хозяйстве.

Обеспокоенность по поводу окружающей среды и здоровья человека, помимо возникающих проблем с устойчивостью, стимулировала исследования и разработку биологических пестицидов. Данное исследование привело к прогрессивному открытию и применению различных энтомопатогенных видов микроорганизмов, включая бактерии.

Парадигма биологических методов борьбы изменилась, когда был открыт потенциал энтомопатогенных бактерий, особенно бактерий, относящихся к роду *Bacillus*, и применен в разработке агентов для биологической борьбы с вредителями. Штаммы бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) использовали в качестве источника пестицидных белков, так как было обнаружено, что штаммы Bt проявляют высокую токсичность против конкретных насекомых. Известно, что штаммы Bt продуцируют дельта-эндотоксины, которые локализованы в параспоральных кристаллических тельцах включения в начале споруляции и во время фазы стационарного роста (например, белки Cry) и также известно, что они продуцирует секретлируемый инсектицидный белок. При проглатывании восприимчивым насекомым, дельта-эндотоксины, а также секретлируемые токсины оказывают свое действие на поверхность эпителия средней кишки, разрушают клеточную мембрану, приводя к разрушению и гибели клеток. Гены, кодирующие инсектицидные белки, также были идентифицированы у бактериальных видов, отличных от Bt, в том числе другие *Bacillus* и множество других видов бактерий, таких как *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls" ранее известный как *Bacillus sphaericus*) и *Paenibacillus popilliae*.

Кристаллические и секретлируемые растворимые инсектицидные токсины являются высокоспецифичными для их хозяев и получили мировое признание как альтернативы химическим инсектицидам.

Например, инсектицидные белки-токсины применяют в различных сельскохозяйственных целях для защиты хозяйственно-ценных растений от заражения насекомыми, уменьшения потребности в применении химических пестицидов и повышения урожайности. Инсектицидные белки-токсины применяют для борьбы с сельскохозяйственными вредителями культурных растений механизированными способами, такими как распыление дисперсных микробных препаратов, содержащих различные штаммы бактерий, на поверхности растений, и с использованием методов генетической трансформации для получения трансгенных растений и семян, экспрессирующих инсектицидный белок-токсин.

Применение трансгенных растений, экспрессирующих инсектицидные белки-токсины, признано в мировом масштабе. Например, в 2012 г. 26,1 млн гектаров были засажены трансгенными культурами, экспрессирующими токсин Bt (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. Краткое содержание отчета ISAAA (Международная служба по сбору сведений о применении биотехнологий в сельском хозяйстве) № 44). Глобальное применение трансгенных культур, защищенных от насекомых, и ограниченное количество инсектицидных белков-токсинов, применяемых для этих культур, создало давление отбора для существующих аллелей насекомых, которые придают устойчивость к применяемым в настоящее время инсектицидным белкам.

Развитие резистентности у целевых вредителей к инсектицидным белкам-токсинам создает постоянную потребность в открытии и разработке новых форм инсектицидных токсичных белков, которые полезны для контроля над повышением резистентности насекомых к трансгенным культурам, экспрессирующим инсектицидные белки-токсины. Новые белковые токсины с повышенной эффективностью, которые контролируют более широкий спектр восприимчивых видов насекомых, уменьшают число выживших насекомых, которые могут развить резистентные аллели. Кроме того, применение в одном растении двух или более трансгенных инсектицидных белков-токсинов, токсичных для одного и того же насекомого-вредителя и демонстрирующих различные способы воздействия, снижает вероятность резистентности у любых отдельных целевых видов насекомых.

Таким образом, изобретатели раскрывают в данном документе новое семейство белковых токсинов из *Raenibacillus ropilliae*, наряду с аналогичными белками токсинов, вариантными белками и типовыми рекомбинантными белками, которые проявляют инсектицидную активность по отношению к определенным видам отряда чешуекрылых, в частности к африканской совке (*Spodoptera exempta*), совке-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совке (*Helicoverpa zea*), совке хлопковой американской (*Alabama argillacea*), капустной моли (*Plutella xylostella*), мотыльку стеблевому кукурузному (*Ostrinia nubilalis*), кукурузной листовой совке (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной листовой совке, устойчивой к Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), совке американской (OWB, *Helicoverpa armigera*), южной совке (*Spodoptera eridania*), соевой совке (*Chrysodeixis includens*), совке пятнистой (*Earias vittella*), огневке кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), табачной листовертке (*Heliothis virescens*), табачной совке (*Spodoptera litura*, также известной как табачный озимый червь), совке бобовой западной (*Striacosta albicosta*) и совке бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*).

Краткое описание сущности изобретения

В данном документе описана новая группа пестицидных белков с ингибирующей активностью по отношению к насекомым (белки-токсины), упоминаемые в данном документе как TIC6757, TIC7472 и TIC7473, принадлежащие к классу белка-токсина TIC6757, которые, как показано, проявляют ингибирующую активность против одного или более вредителей сельскохозяйственных растений. Белок TIC6757 и белки в классе белка-токсина TIC6757 могут применяться отдельно или в сочетании с другими инсектицидными белками и токсичными веществами в препаратах и *in planta*, таким образом обеспечивая альтернативы инсектицидным белкам и химии инсектицидов, которые в настоящее время используются в сельскохозяйственных системах.

В одном варианте реализации изобретения в данной заявке представлена молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая гетерологичный промоторный фрагмент, функционально связанный с полинуклеотидным сегментом, кодирующим пестицидный белок или его фрагмент, при этом (a) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (b) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (c) указанный полинуклеотидный сегмент гибридизуется с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; или (d) указанный полинуклеотидный сегмент, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 65, или 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17; или (e) указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с вектором, и указан-

ный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, фагмиды, бакмиды, космиды и бактериальной или дрожжевой искусственной хромосомы. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая функционирует, экспрессируя пестицидный белок в растении; или экспрессируется в растительной клетке продуцируя пестицидно эффективное количество пестицидного белка.

В другом варианте реализации изобретения данной заявки присутствуют клетки-хозяева, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты данной заявки, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной и растительной клетки. Рассматриваемые бактериальные клетки-хозяева включают в себя *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* и *Erwinia*. В определенных вариантах реализации изобретения указанными видами *Bacillus* являлись *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанным *Brevibacillus* являлся *Brevibacillus laterosporus*, или *Escherichia* являлся *Escherichia coli*. Рассматриваемые клетки-хозяева растений включают в себя растительную клетку двудольных и растительную клетку однодольных. Рассматриваемые растительные клетки дополнительно включают растительную клетку люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты, *Brassica*, моркови, маниоки, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокосовой пальмы, кофе, кукурузы, клевера, хлопчатника (*Gossypium* sp.), тыквенных, огурца, Дугласовой пихты, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата-латука, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливы, лука, декоративного растения, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневищных злаков, ржи, американского шафрана, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза и пшеницы.

В другом варианте реализации изобретения пестицидный белок проявляет активность против чешуекрылых насекомых, в том числе совки бархатных бобов, огневки тростниковой, точильщика зернового кукурузного, совки хлопковой, табачной листовертки, соевой совки, африканской совки, южной совки, кукурузной листовой совки, совки свекольной, совки американской, азиатской хлопковой совки, розового коробочного червя хлопчатника, совки-ипсилон, огневки кукурузной юго-западной, совки хлопковой американской, капустной моли, совки пятнистой, табачной совки, совки бобовой западной и мотылька стеблевого кукурузного.

Также в данной заявке рассматриваются растения, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую гетерологичный промоторный фрагмент, функционально связанный с полинуклеотидным сегментом, кодирующим пестицидный белок или его фрагмент, причем: (a) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (b) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (c) указанный полинуклеотидный сегмент гибридизуется в жестких условиях гибридизации с комплементарной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17; или (d) указанное растение демонстрирует определенное количество указанного пестицидного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения пестицидный белок содержит SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18. В одном варианте реализации изобретения растение представляет собой двудольное растение или однодольное растение. В другом варианте реализации изобретения растение дополнительно выбирают из группы, состоящей из люцерны, банана, ячменя, бобов, брокколи, капусты, *Brassica*, моркови, маниоки, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокосовой пальмы, кофе, кукурузы, клевера, хлопчатника, тыквенных, огурца, Дугласовой пихты, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата-латука, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливы, лука, декоративного растения, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневищных злаков, ржи, американского шафрана, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза и пшеницы.

В дополнительных вариантах реализации изобретения описываются семена, содержащие молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

В другом варианте реализации изобретения рассматривается описанная в данной заявке композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащая молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один другой пестицидный агент, который отличается от указанного пестицидного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один другой пестицидный агент выбирают из

группы, состоящей из белка, обладающего ингибиторной активностью по отношению к насекомым, молекулы дцРНК, обладающей ингибиторной активностью по отношению к насекомым, и вспомогательного белка. Также предполагается, что по меньшей мере один другой пестицидный агент в композиции, обладающей ингибирующей активностью по отношению к насекомым, проявляет активность против одного или более видов вредителей отрядов чешуекрылых, жесткокрылых или полужесткокрылых. По меньшей мере один другой пестицидный агент в композиции, обладающей ингибирующей активностью по отношению к насекомым, находится в одном варианте реализации изобретения, выбранном из группы, состоящей из Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C; вариантов Cry1C Cry1D, Cry1E, Cry1F, химер Cry1A/F; Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, вариантов Cry3A; Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113 и AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z и AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1 и их вариантов, IP3 и его вариантов, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 и белка DIG-11.

Также рассматриваются товарные продукты, содержащие обнаруживаемое количество молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в данной заявке. Такие товарные продукты включают в себя товарную кукурузу, упакованную обработчиком зерна, кукурузные хлопья, кукурузные лепешки, кукурузную муку, кукурузную муку крупного помола, кукурузный сироп, кукурузное масло, кукурузный силос, кукурузный крахмал, кукурузную кашу и тому подобное, а также соответствующие товарные продукты из сои, риса, пшеницы, сорго, голубинового гороха, арахиса, фруктов, дыни и овощей, включая, где это применимо, соки, концентраты, джемы, желе, мармелады и другие съедобные формы таких товарных продуктов, содержащих обнаруживаемое количество таких полинуклеотидов и/или полипептидов данной заявки, цельные или обработанные семена хлопчатника, хлопковое масло, линт, семена и части растений, обработанные для корма или продуктов питания, волокно, бумагу, биомассы и топливные продукты, такие как топливо, полученное из хлопкового масла или пеллетов, полученных из отходов хлопковой очистки, цельных или обработанных семян сои, соевого масла, соевого белка, соевой муки крупного помола, соевой муки, соевых хлопьев, соевых отрубей, соевого молока, соевого сыра, соевого вина, корма для животных, содержащего соевые бобы, бумаги, содержащей сою, сливок, содержащих сою, биомассы соевых бобов и топливных продуктов, произведенных с использованием растений сои и частей растений сои.

В данной заявке также рассматривается способ производства семян, содержащих молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в данной заявке. Способ включает посадку по меньшей мере одного из семени, содержащего молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в данной заявке; выращивание растения из семени; и сбориение семени из растений, причем собранное семя содержит молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты данной заявки.

В другом иллюстративном варианте реализации изобретения предлагается растение, устойчивое к заражению насекомыми, в котором клетки указанного растения содержат: (а) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую инсектицидно эффективное количество пестицидного белка, изложенную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (б) инсектицидно эффективное количество белка, содержащего аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85, или 90, или 95, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18.

Также в данной заявке описаны способы борьбы с вредителями видов чешуекрылых и борьбы с поражением растений вредителями видов чешуекрылых, в частности сельскохозяйственной культуры. В одном варианте реализации изобретения способ включает: (а) контактирование вредителя с инсектицидно эффективным количеством пестицидных белков, как указано в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (б) приведение в контакт вредителя с инсектицидно эффективным количеством одного или более пестицидных белков, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85, или 90, или 95, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18.

Дополнительно в данном документе предлагается способ обнаружения наличия молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидный сегмент, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, в котором: (а) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (б) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 65, или 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID

NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18; или (с) указанный полинуклеотидный сегмент гибридизуется с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17. В одном варианте реализации изобретения способ включает контактирование образца нуклеиновых кислот с зондом на основе нуклеиновой кислоты, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с геномной ДНК из растения, содержащего полинуклеотидный сегмент, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, представленный в данном документе, и не гибридизуется в таких условиях гибридизации с геномной ДНК из другого изогенного растения, которое не содержит сегмент, при этом зонд является гомологичным или комплементарным к SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, или последовательности, которая кодирует пестицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 65, или 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18. Способ может дополнительно включать в себя: (а) применение к образцу и зонду жестких условий гибридизации; и (б) обнаружение гибридизации зонда с ДНК образца.

Также изобретением предусмотрены способы обнаружения наличия пестицидного белка или его фрагмента в образце, содержащем белок, причем указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; или указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 65, или 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95, или 98, или 99, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18. В одном варианте реализации изобретения способ включает: (а) контактирование образца с иммунореактивным антителом; и (б) обнаружение наличия белка. В некоторых вариантах реализации изобретения этап обнаружения включает в себя твердофазный иммуноферментный анализ ELISA или вестерн-блоттинг.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC6757, полученный из вида *Paenibacillus popilliae* DSC004343.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC6757.

SEQ ID NO: 3 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, кодирующую пестицидный белок TIC6757PL, предназначенный для экспрессии в растительной клетке, причем дополнительный кодон аланина встраивается сразу после иницирующего кодона метионина.

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность TIC6757PL, кодируемую синтетической кодирующей последовательностью, предназначенной для экспрессии в растительной клетке (SEQ ID NO: 3), и причем дополнительная аминокислота аланина встраивается сразу после иницирующего метионина.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC6757_His, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гистидиновую метку, функционально связана 5' и находится в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью TIC6757.

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC6757_His.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7472, полученный из вида *Paenibacillus popilliae* DSC007648.

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7242.

SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7472_His, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гистидиновую метку, функционально связана 3' и находится в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью TIC7472.

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7472_His.

SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7473 с открытой рамки считывания в нуклеотидных позициях 1-2391 и кодон терминации трансляции.

SEQ ID NO: 12 представляет собой трансляцию аминокислотной последовательности пестицидного белка TIC7243, полученного из вида *Paenibacillus popilliae* DSC008493.

SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7473_His, причем последовательность нуклеиновой кислоты, коди-

рующая гистидиновую метку, функционально связана 3' и находится в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью TIC7472.

SEQ ID NO: 14 представляет собой трансляцию аминокислотной последовательности пестицидного белка TIC7473_{His}.

SEQ ID NO: 15 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, кодирующую пестицидный белок TIC7472PL, предназначенный для экспрессии в растительной клетке, причем дополнительный кодон аланина встраивается сразу после иницирующего кодона метионина.

SEQ ID NO: 16 представляет собой аминокислотную последовательность TIC7472PL, кодируемую синтетической кодирующей последовательностью, предназначенной для экспрессии в растительной клетке (SEQ ID NO: 15), и причем дополнительная аминокислота аланина встраивается сразу после иницирующего метионина.

SEQ ID NO: 17 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, кодирующую пестицидный белок TIC7473PL, предназначенный для экспрессии в растительной клетке, причем дополнительный кодон аланина встраивается сразу после иницирующего кодона метионина.

SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность TIC7473PL, кодируемую синтетической кодирующей последовательностью, предназначенной для экспрессии в растительной клетке (SEQ ID NO: 17), и причем дополнительная аминокислота аланина встраивается сразу после иницирующего метионина.

Подробное описание изобретения

Проблема в области борьбы с сельскохозяйственными вредителями может быть охарактеризована как потребность в новых белках-токсинах, которые эффективны против целевых вредителей, проявляют токсичность широкого спектра по отношению к целевым видам вредителей, способны экспрессироваться в растениях, не вызывая нежелательных агрономических проблем, и обеспечивают альтернативный способ воздействия по сравнению с существующими на сегодняшний день токсинами, которые используют в растениях в коммерческих целях.

В данном документе раскрыты новые пестицидные белки, примерами которых являются TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL, обладающие ингибирующей активностью, в частности, против широкого спектра насекомых-вредителей отряда чешуекрылых и, более конкретно, африканской совки (*Spodoptera exempta*), совки-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (*Helicoverpa zea*), совки хлопковой американской (*Alabama argillacea*), капустной моли (*Plutella xylostella*), мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной листовой совки, устойчивой к Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), совки американской (OWB, *Helicoverpa armigera*), южной совки (*Spodoptera eridania*), соевой совки (*Chrysodeixis includens*), совки пятнистой (*Earias vittella*), огневки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), табачной листовёртки (*Heliothis virescens*), табачной совки (*Spodoptera litura*, также известной как табачный озимый червь), совки бобовой западной (*Striacosta albicosta*) и совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*).

Ссылка в этой заявке на TIC6757, "белок TIC6757", "белковый токсин TIC6757", "белок-токсин TIC6757", "пестицидный белок TIC6757", "токсины, связанные с TIC6757", "белки-токсины, связанные с TIC6757", TIC6757PL, "белок TIC6757PL", "белковый токсин TIC6757PL", "белок-токсин TIC6757PL", "пестицидный белок TIC6757PL", "токсины, связанные с TIC6757PL", "белки-токсины, связанные с TIC6757PL", TIC7472, "белок TIC7472", "белковый токсин TIC7472", "белок-токсин TIC7472", "пестицидный белок TIC7472", "токсины, связанные с TIC7472", "белки-токсины, связанные с TIC7472", TIC7472PL, "белок TIC7472PL", "белковый токсин TIC7472PL", "белок-токсин TIC7472PL", "пестицидный белок TIC7472PL", "токсины, связанные с TIC7472PL", "белки-токсины, связанные с TIC7472PL", TIC7473, "белок TIC7473", "белковый токсин TIC7473", "белок-токсин TIC7473", "пестицидный белок TIC7473", "токсины, связанные с TIC7473", "белки-токсины, связанные с TIC7473", TIC7473PL, "белок TIC7473PL", "белковый токсин TIC7473PL", "белок-токсин TIC7473PL", "пестицидный белок TIC7473PL", "токсины, связанные с TIC7473PL", "белки-токсины, связанные с TIC7473PL" и тому подобное, относится к любому новому пестицидному белку или белку, проявляющему ингибирующую активность по отношению к насекомому, который содержит, состоит из, или который является по существу гомологичным, который является подобным, или который получен из любой пестицидной белковой или проявляющей ингибирующую активность по отношению к насекомым белковой последовательности TIC6757 (SEQ ID NO: 2), TIC6757PL (SEQ ID NO: 4), TIC7472 (SEQ ID NO: 8), TIC7472PL (SEQ ID NO: 16), TIC7473 (SEQ ID NO: 12) или TIC7473PL (SEQ ID NO: 18) и их пестицидные или проявляющие ингибирующую активность по отношению к насекомым сегменты, или их комбинации, которые придают активность против вредителей отряда чешуекрылых, включая любой белок, проявляющий пестицидную или ингибирующую активность по отношению к насекомым, если выравнивание такого белка с TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL приводит к идентичности аминокислотной последовательности, выраженной в любом проценте от около 85 до около 100%. Белки TIC6757 и TIC6757PL включают как нацеленную на пластид, так и не нацеленную на пластиды форму белков.

Термин "сегмент" или "фрагмент" используется в данной заявке для описания непрерывных после-

довательностей аминокислот или нуклеиновых кислот, которые короче, чем полная аминокислотная или нуклеотидная последовательность, описывающая белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Сегмент или фрагмент, проявляющий ингибирующую активность в отношении насекомых, также раскрыт в данной заявке, если выравнивание такого сегмента или фрагмента с соответствующим участком белка TIC6757, изложенным в SEQ ID NO: 2, белка TIC6757PL, изложенным в SEQ ID NO: 4, белка TIC7472, изложенным в SEQ ID NO: 8, белка TIC7472PL, изложенным в SEQ ID NO: 16, белка TIC7473, изложенным в SEQ ID NO: 12 или белка TIC7473PL, изложенным в SEQ ID NO: 18, приводит к идентичности аминокислотной последовательности, выраженной в любом проценте от около 85 до около 100 процентов между сегментом или фрагментом и соответствующим участком белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL.

В контексте настоящей заявки термины "активная" или "активность", "пестицидная активность" или "пестицидная" или "инсектицидная активность", "ингибитор в отношении насекомых" или "инсектицидная" относятся к эффективности токсического вещества, такого как белок-токсин, в ингибировании (ингибировании роста, питания, плодовитости или жизнеспособности), подавлении (подавлении роста, кормления, плодовитости или жизнеспособности), борьбе (борьбе с поражением насекомыми-вредителями, контроле интенсивности питания насекомых-вредителей на определенной культуре, содержащей эффективное количество белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL), или уничтожении (вызывающем заболеваемость, смертность или снижение плодовитости) вредителя. Эти термины призваны включать результат обеспечения пестицидно эффективного количества токсичного белка для вредителя, при котором воздействие токсичного белка на вредителя приводит к заболеваемости, смертности, снижению плодовитости или задержке роста. Данные термины также включают отпугивание вредителя от растения, ткани растения, части растения, семян, растительных клеток или от конкретного географического местоположения, причем растение может расти, в результате обеспечения пестицидно эффективного количества токсичного белка в или на растении. В общем, пестицидная активность относится к способности токсичного белка 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 без ограничений, насекомых отряда чешуекрылых. Токсичный белок может быть произведен растением или может быть применен к растению или к окружающей среде в том месте, где находится растение. Термины "биоактивность", "эффективный", "действенный" или их вариации также являются терминами, взаимозаменяемо используемыми в настоящей заявке, для описания воздействия белков настоящего изобретения на целевых насекомых-вредителей.

Пестицидно эффективное количество токсического вещества, обеспеченное в рационе целевого вредителя, проявляет пестицидную активность при контакте токсического вещества с вредителем. Токсичное вещество может представлять собой пестицидный белок или одно, или более химических веществ, известных в данной области техники. Пестицидные или инсектицидные химические вещества и пестицидные или инсектицидные белковые агенты могут быть использованы по отдельности или в сочетании друг с другом. Химические вещества включают в себя, но без ограничений, молекулы дцРНК, нацеленные на специфические гены для супрессии в целевом вредителе, органохлориды, органофосфаты, карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды и рианоиды. Пестицидные или инсектицидные белковые агенты включают белковые токсины, изложенные в данной заявке, а также другие белковые токсичные вещества, включая те, которые нацелены на чешуекрылых, а также белковые токсины, которые используются для борьбы с другими вредителями растений, такие как белки Cry и Cyt, доступные в данной области техники для применения при борьбе с видами отрядов жесткокрылых, полужесткокрылых и равнокрылых.

Предполагается, что ссылка на вредителя, особенно вредителя сельскохозяйственного растения, означает вредителей культурных растений, особенно тех насекомых вредителей отряда чешуекрылых, которые контролируются классом белков-токсинов TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Однако ссылка на насекомого-вредителя может также включать насекомых-вредителей отряда жесткокрылых, полужесткокрылых и равнокрылых, а также нематоды и грибы при тех условиях, когда токсичные агенты, нацеленные на этих вредителей, совместно локализируются или присутствуют вместе с белком TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, или белком, который имеет от около 85 до около 100% идентичности с TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL.

Белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL связаны общей функцией и проявляют инсектицидную активность по отношению к насекомым-вредителям из видов насекомых отряда чешуекрылых, включая имаго, куколок, личинок и новорожденных.

Насекомые отряда чешуекрылых включают, но без ограничений, гусениц, совок, пядениц и представителей подсемейства *Heliothinae* семейства *Noctuidae*, например, кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), совку помидорную (*Spodoptera exigua*), африканскую совку (*Spodoptera exempta*), южную совку (*Spodoptera eridania*), совку латуковую (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*),

совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Pseudoplusia includens*), совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), совку клеверную (*Hypena scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*); точильщиков, чехлоносок, бабочек, огневков шишковых, гусениц бабочки капустницы и пироморфид из семейства *Pyrulidae*, например, 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*); листоверток, дымчатых листоверток, плодоярков и плодовых листоверток из семейства *Tortricidae*, например, плодоярку яблонную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), листовертку восточную (*Grapholita molesta*), листовертку подсолнечника (*Suleima helianthana*); и многих других экономически важных чешуекрылых, например, капустную моль (*Plutella xylostella*), розового коробочного червя (*Pectinophora gossypiella*) и шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Другие насекомые-вредители отряда чешуекрылых, включают в себя, например, совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*), листовертку плодовых деревьев (*Archips argyospila*), листовертку плодовых деревьев (*Archips gosana*) и других представителей листоверток, (*Chilo suppressalis*, огневку стеблевую азиатскую или желтую рисовую огневку), листовертку рисовую (*Snaphalocrocis medinalis*), листовертку рисовую (*Crambus caliginosellus*), гусеницу мятлика (*Crambus teterrellus*), гусеницу мятлика (*Diatraea grandiosella*), тростниковую огневку (*Diatraea saccharalis*), тростниковую огневку (*Earias insulana*), совку пятнистую (*Earias vittella*), совку американскую (*Helicoverpa armigera*), американскую кукурузную совку (*Helicoverpa zea*, также известную как совка хлопковая), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), мотылька лугового (*Herpetogramma licarsisalis*), совку бобовую западную (*Striacosta albicosta*), листовертку виноградную (*Lobesia botrana*), цитрусовую минирующую моль (*Phyllocnistis citrella*), белянку капустную (*Pieris brassicae*), белянку репную (*Pieris rapae*, также известную как репница), совку свекольную (*Spodoptera exigua*), табачную совку (*Spodoptera litura*, также известную как табачный озимый червь) и томатную минирующую моль (*Tuta absoluta*).

В контексте настоящей заявки термин "выделенная молекула ДНК" или эквивалентный термин или фраза означает, что молекула ДНК представляет собой молекулу ДНК, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не в ее естественной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, терминирующая последовательность транскрипции и тому подобные, которые, естественно, находятся в ДНК генома организма, не считаются "выделенными" до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природе. Тем не менее, каждый из этих элементов и их части были бы "выделены" в рамках настоящего описания при условии, если элемент не находится внутри генома организма и не в том месте в геноме, в котором он встречается в природе. 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 количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарах, полученных из растения или бактерии.

Как описано далее в данной заявке, открытая рамка считывания (OPC), кодирующая TIC6757 (SEQ ID NO: 19), была обнаружена в ДНК, полученной из штамма DSC004343 *Paenibacillus popilliae*. Кодирующую последовательность клонировали и экспрессировали в микробных клетках-хозяевах для получения рекомбинантных белков, используемых в биологических анализах. Методы скрининга с высокой пропускной способностью и методы биоинформатики использовали для скрининга последовательностей для генов, кодирующих белки, имеющие сходство с TIC6757. Открытая рамка считывания (OPC), кодирующая TIC7472 (SEQ ID NO: 7), была обнаружена в ДНК, полученной из штамма DSC007648 *Paenibacillus popilliae*. Открытая рамка считывания (OPC), кодирующая TIC7473 (SEQ ID NO: 11), была обнаружена в ДНК, полученной из штамма DSC008493 *Paenibacillus popilliae*. Биологический анализ с использованием белков TIC6757, полученных из микробиологических клеток-хозяев, продемонстрировал активность против видов отряда чешуекрылых совки помидорной (*Spodoptera exigua*), совки-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (*Helicoverpa zea*), совки хлопковой американской (*Alabama argillacea*), капустной моли (*Plutella xylostella*), мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной листовой совки, устойчивой к Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), совки американской (OWB, *Helicoverpa armigera*), южной

совки (*Spodoptera eridania*), соевой совки (*Chrysodeixis includens*), совки пятнистой (*Earias vittella*), огневки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), табачной листоверки (*Heliothis virescens*), табачной совки (*Spodoptera litura*, также известной как табачный озимый червь) и совки бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*). Биологический анализ с использованием белков TIC7472 и TIC7473, полученных из микробиологических клеток-хозяев, продемонстрировал активность против видов отряда чешуекрылых американской кукурузной совки (*Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*), южной совки (*Spodoptera eridania*), соевой совки (*Chrysodeixis includens*) и огневки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*).

Для экспрессии в растительных клетках белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL могут экспрессироваться так, чтобы они находились в цитозоле или были нацелены на различные органеллы растительной клетки. Например, нацеливание белка на хлоропласты может приводить к увеличению уровней экспрессированного белка в трансгенном растении, предотвращая появление признаков иных фенотипов. Нацеливание может также приводить к повышению резистентности к вредителям у трансгенного объекта. Целевой пептид или транзитный пептид представляет собой короткую пептидную цепь (длиной 3-70 аминокислот), которая направляет транспортировку белка в определенную область клетки, включая ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭР), хлоропласты, апопласт, пероксисомы и плазматическую мембрану. Некоторые целевые пептиды отщепляются от белка под действием сигнальной пептидазы после транспортирования белков. Для нацеливания на хлоропласты белки содержат транзитные пептиды, которые содержат около 40-50 аминокислот. Для описания применения транзитных пептидов хлоропластов, см., патенты США № 5188642 и 5728925. Многие локализованные на хлоропластах белки экспрессируются из ядерных генов как предшественники и нацелены на хлоропласты транзитным пептидом хлоропластов (ТПХ). Примеры таких выделенных хлоропластных белков включают, но без ограничений, такие, которые связаны с малой субъединицей (МСУ) рибулозо-1,5,-бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксином, ферредоксин-оксидоредуктазой, белком I и белком II светособирающего комплекса, тиоредоксином F, 5-енолпируват-шкимаат-3-фосфатсинтазой (ЕПШФС) и транзитными пептидами, описанными в патенте США №7193133. В условиях *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что нехлоропластные белки могут быть нацелены на хлоропласты с использованием белковых гибридов с гетерологичным ТПХ и что наличия ТПХ достаточно для нацеливания белка на хлоропласты. Включение подходящего хлоропластного транзитного пептида, такого как ЕПШФС ТПХ *Arabidopsis thaliana* (ТПХ2) (см., Klee и соавт., *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) или ЕПШФС ТПХ *Petunia hybrida* (ТПХ4) (см., della-Cioppa и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6873-6877, 1986) было показано, что они нацеливают гетерологичные последовательности белка ЕПШФС на хлоропласты в трансгенных растениях (см., патенты США № 5627061; 5633435, 5312910 и EP 0218571; EP 189707; EP 508909; и EP 924299). Для нацеливания белка-токсина TIC6757 или TIC6757PL на хлоропласты, последовательность, кодирующая транзитный пептид хлоропластов, расположена 5' в функциональной связи и в одной рамке считывания с синтетической кодирующей последовательностью, кодирующей белок-токсин TIC6757 или TIC6757PL, который был сконструирован для оптимальной экспрессии в растительных клетках.

Предполагается, что дополнительные последовательности белка-токсина, связанные с TIC6757, TIC7472 и TIC7473, могут быть созданы с использованием аминокислотной последовательности TIC6757, TIC7472 или TIC7473 для создания новых белков с новыми свойствами. Белки-токсины TIC6757, TIC7472 и TIC7473 могут быть выровнены с целью объединения различий на уровне аминокислотной последовательности для новых вариантов аминокислотных последовательностей и внесения соответствующих изменений в последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует варианты.

Данное описание дополнительно предполагает, что улучшенные варианты класса белка-токсина TIC6757 могут быть сконструированы *in planta* с использованием различных способов геной инженерии, известных в данной области техники. Такие технологии, используемые в геной инженерии, включают в себя, но без ограничений, ZFN (нуклеазу с цинковыми пальцами), мегануклеазы, TALEN (эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и системы CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/Cas (CRISPR-ассоциированные). Такие способы геной инженерии могут быть использованы для изменения кодирующей последовательности белка-токсина, трансформированной в растительную клетку, в другую последовательность, кодирующую токсин. В частности, с помощью этих способов один или более кодонов в кодирующей последовательности токсина изменяются с целью разработки новой белковой аминокислотной последовательности. В альтернативном варианте, фрагмент в пределах кодирующей последовательности заменяется или удаляется, или дополнительные фрагменты ДНК вставляются в кодирующую последовательность для создания новой кодирующей последовательности токсина. Новая кодирующая последовательность может кодировать белок-токсин с новыми свойствами, такими как повышенная активность или увеличенный спектр против насекомых-вредителей, а также обеспечивать активность против видов насекомых-вредителей, которые развили устойчивость против исходного белка-токсина. Растительная клетка, содержащая редактированную последовательность гена токсина, может быть использована с помощью

способов известных в данной области техники, для получения целых растений, экспрессирующих новый белок-токсин.

Также предполагается, что фрагменты белков TIC6757, TIC7472 и TIC7473 или их варианты могут быть укороченными формами с ингибирующей активностью в отношении насекомых, причем одна или более аминокислот удаляются с N-конца, C-конца, середины белка или их комбинаций, при этом фрагменты и варианты сохраняют ингибирующую активность в отношении насекомых. Эти фрагменты могут быть естественного происхождения или синтетическими вариантами TIC6757, TIC7472 и TIC7473, или вариантами производного белка, но должны сохранять ингибирующую активность в отношении насекомых, по меньшей мере, TIC6757, TIC7472 или TIC7473.

Белки, которые имеют сходство с белками TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL, можно идентифицировать и сравнивать друг с другом с использованием различных компьютерных алгоритмов, известных в данной области техники (см., табл. 1 и 2). Идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в данной заявке, являются результатом выравнивания Clustal W с использованием данных параметров по умолчанию: Матрица сравнения: 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, и соавт (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Процент идентичности аминокислот далее рассчитывается 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 рассмотрены в данном документе.

Предполагается, что белок, проявляющий ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда чешуекрылых, связан с TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, если белок используется в запросе, например, в выравнивании Clustal W, и белки данного изобретения, изложенные в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 18, идентифицированы как совпадения в таком выравнивании, в котором искомым белком проявляет по меньшей мере от 85 до около 100% аминокислотной идентичности по длине искомого белка, который составляет около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или любой процент в этом диапазоне.

Типовые белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL были выровнены друг с другом с использованием алгоритма Clustal W. Была создана матрица пар процента идентичности аминокислотных последовательностей для каждого из полноразмерных белков, как указано в табл. 1.

Таблица 1. Отображение матрицы пар типовых белков TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL

Токсин	TIC6757 (SEQ ID NO: 2)	TIC6757PL (SEQ ID NO: 4)	TIC7472 (SEQ ID NO: 8)	TIC7472PL (SEQ ID NO: 16)	TIC7473 (SEQ ID NO: 12)	TIC7473PL (SEQ ID NO: 18)
TIC6757 (SEQ ID NO: 2)	-	99,9 (796)	99,7 (795)	99,6 (794)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC6757PL (SEQ ID NO: 4)	99,7 (796)	-	99,5 (794)	99,7 (796)	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7472 (SEQ ID NO: 8)	99,7 (795)	99,6 (794)	-	99,9 (796)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC7472PL (SEQ ID NO: 16)	99,5 (794)	99,7 (796)	99,7 (796)	-	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7473 (SEQ ID NO: 12)	99,9 (796)	99,7 (795)	99,9 (796)	99,7 (795)	-	99,9 (796)
TIC7473PL (SEQ ID NO: 18)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,7 (796)	-

Описание таблицы: Выравнивание с использованием Clustal W между (X) и (Y) представлено в матрице пар. Вычисляется процент идентичности аминокислот между всеми парами и представляется первым числом в каждом поле. Второе число (в скобках) в каждом поле представляет собой количество идентичных аминокислот между парой.

В дополнение к проценту идентичности, TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, TIC7473PL и родственные белки также могут быть близки по первичной структуре (консервативные аминокислотные мотивы), по длине (около 797 аминокислот) и другим характеристикам. Характеристики белковых токсинов TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL приведены в табл. 2.

Таблица 2. Выбранные характеристики белков TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL

Белок	Молекулярная масса (в дальтонах)	Аминокислотная длина	Изoeлектрическая точка	Заряд при pH 7,0	Количество сильнокислых (-) аминокислот	Количество сильнокислых аминокислот	Количество гидрофобных аминокислот	Количество полярных аминокислот
TIC6757	90011,21	797	4,4289	-34,5	81	112	391	406
TIC6757PL	90082,29	798	4,4289	-34,5	81	112	392	406
TIC7472	90096,28	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7472PL	90167,36	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407
TIC7473	90069,25	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7473PL	90140,33	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407

Как описано далее в примерах данной заявки, синтетическая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая вариант TIC6757, TIC6757PL, была сконструирована для применения в растениях. Иллюстративная последовательность молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая белок TIC6757PL, которая была сконструирована для применения в растениях, представлена в SEQ ID NO: 3. Белок TIC6757PL имеет дополнительную аминокислоту аланин сразу после иницирующего метионина относительно белка TIC6757. Считается, что дополнительный остаток аланина, введенный в аминокислотную последовательность TIC6757, улучшает экспрессию белка in planta. Аналогичным образом, синтетические последовательности молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты TIC7472 и TIC7473, упоминаются в данном документе как TIC7472PL и TIC7473PL, соответственно, и сконструированы для применения в растениях. Типовые синтетические последовательности молекул нуклеиновой кислоты, которые были сконструированы для применения в растениях, кодирующие TIC7472PL и TIC7473PL, представлены в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17 соответственно. Оба белка TIC7472PL и TIC7473PL имеют дополнительную аминокислоту аланин сразу после иницирующего метионина относительно белков TIC7472 и TIC7473.

Экспрессионные кассеты и векторы, содержащие рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, могут быть сконструированы и введены в клетки растений кукурузы, сои или хлопчатника в соответствии со способами и методиками трансформации, известными в данной области техники. Например, опосредованная *Agrobacterium* трансформация описана в публикациях патентной заявки США 2009/0138985A1 (соя), 2008/0280361A1 (соя), 2009/0142837A1 (кукуруза), 2008/0282432 (хлопчатник), 2008/0256667 (хлопчатник), 2003/0110531 (пшеница), 2001/0042257 A1 (сахарная свекла), патенты США № 5750871 (канола), 7026528 (пшеница) и 6365807 (рис), и в *Agencibia* и соавт. (1998) *Transgenic Res.* 7:213-222 (сахарный тростник) полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Трансформированные клетки могут быть воспроизведены в трансформированные растения, которые экспрессируют белки TIC6757PL, TIC7472 и TIC7473, и демонстрируют пестицидную активность посредством биологических анализов, проводимых в присутствии личинок вредителей отряда чешуекрылых, с использованием листовых дисков, полученных из трансформированных растений. Растения могут быть получены из растительных клеток путем регенерации, из семян, пыльцы или меристемы, полученными способами трансформации. Способы трансформации растений известны в данной области техники.

В качестве альтернативы традиционным способам трансформации, последовательность ДНК, такая как трансген, экспрессионная кассета(ты) и тому подобные, может быть вставлена или интегрирована в конкретный сайт или локус в геноме растения или растительной клетки через сайт-направленную интеграцию. Таким образом, конструкция(ции) рекомбинантной ДНК и молекула(ы) данного описания могут включать в себя последовательность донорной матрицы, содержащую по меньшей мере один трансген, экспрессионную кассету или другую последовательность ДНК для вставки в геном растения или растительной клетки. Такая донорная матрица для сайт-направленной интеграции может дополнительно включать в себя одно или два гомологичных "плеча", фланкирующие последовательность вставки (то есть, последовательность, трансген, кассету и тому подобное, которые должны быть вставлены в растительный геном). Конструкция(ции) рекомбинантной ДНК данного описания может дополнительно содержать экспрессионную кассету(ты), кодирующую сайт-специфическую нуклеазу и/или любой связанный белок(ки) для осуществления сайт-направленной интеграции. Такая кассета(ты), экспрессирующая нуклеазу, может присутствовать в той же молекуле или векторе, что и донорная матрица (в цис) или на отдельной молекуле или векторе (в транс). В данной области техники известно несколько способов сайт-направленной интеграции с участием различных белков (или комплексов белков и/или направляющей РНК), которые разрезают геномную ДНК для получения двухцепочечного разрыва (ДЦР, DSB-double strand break) или ника на желаемом геномном сайте или локусе. Вкратце, как понятно из уровня техники, в процессе репарации ДЦР или ника, произведенных ферментом нуклеазы, ДНК донорной матрицы может интегрироваться в геном в месте ДЦР или ника. Наличие гомологичного "плеча(чей)" в донорной

матрице может способствовать внедрению и нацеливанию последовательности вставки в геном растения во время процесса репарации посредством гомологичной рекомбинации, несмотря на то, что вставка может происходить посредством негомологичного соединения концов (NHEJ-non-homologous end joining). Примерами используемых сайт-специфичных нуклеаз являются нуклеазы с цинковыми пальцами, сконструированные или нативные мегануклеазы, TALE-эндонуклеазы и управляемые при помощи РНК-гидов эндонуклеазы (например, Cas9 или Cpf1). Для способов использования управляемых при помощи РНК-гидов сайт-специфических эндонуклеаз (например, Cas9 или Cpf1), конструкция(-ции) рекомбинантной ДНК также будет содержать последовательность, кодирующую одну или более направляющих РНК для направления нуклеазы на желаемый участок в геноме растения.

Рассматриваются композиции молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL. Например, белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL могут быть экспрессированы конструкциями рекомбинантной ДНК, в которых молекула полинуклеотида с ОРС (открытой рамкой считывания), кодирующая белок, функционально связана с элементами генетической экспрессии, такими как промотор и любым другим регуляторным элементом, необходимым для экспрессии в системе для которой предназначена данная конструкция. Неограничивающие примеры включают функциональный промотор растения, функционально связанный с кодирующей последовательностью белка TIC6757PL, TIC7472PL или TIC7473PL, для экспрессии белка в растениях, или Vt-функциональный промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью белка TIC6757, TIC7472 или TIC7473, для экспрессии белка в Vt бактерии или других видах рода *Bacillus*. Другие элементы могут быть функционально связаны с кодирующей последовательностью белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, включая, но без ограничений, энхансеры, интроны, нетранслируемые лидерные последовательности, кодированные белковые иммобилизационные метки (гистидиновые метки), транслокационные пептиды (то есть, пластидные транзитные пептиды, сигнальные пептиды) полипептидные последовательности для посттрансляционных модифицирующих ферментов, сайты связывания рибосом и сайты-мишени РНКи. Типовые рекомбинантные полинуклеотидные молекулы, представленные в данном документе, включают, но без ограничений, гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, таким как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SIQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17, который кодирует соответствующие полипептиды или белки, имеющие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18. Гетерологичный промотор также может быть функционально связан с синтетическими кодирующими последовательностями ДНК, которые кодируют TIC6757PL, TIC7472PL или TIC7473PL нацеленный на пластиды; или TIC6757PL, TIC7472PL или TIC7473PL не нацеленный на пластиды. Кодоны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие белки, описанные в данном документе, могут быть заменены синонимичными кодонами (известны в данной области техники как молчащие замены).

Конструкция рекомбинантной ДНК, содержащая последовательность, кодирующую белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, может дополнительно содержать область ДНК, которая кодирует одно или более веществ, обладающих ингибирующей активностью в отношении насекомых, которые могут быть сконструированы для одновременной экспрессии или коэкспрессии с последовательностью ДНК, кодирующей белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, белок отличный от белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых, или вспомогательный белок. Вспомогательные белки включают в себя, но без исключений, кофакторы, ферменты, партнеры по связыванию или другие агенты, которые способствуют повышению эффективности агента, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, например, способствуя его экспрессии, влияя на его стабильность в растениях, оптимизируя свободную энергию для олигомеризации, увеличивая его токсичность и увеличивая спектр его активности. Вспомогательный белок может облегчать захват одного или более веществ, обладающих ингибирующей активностью в отношении насекомых, например, или усиливать токсическое действие токсического вещества.

Конструкцию рекомбинантной ДНК можно собирать так, чтобы все белки или молекулы дцРНК экспрессировались из одного промотора, или каждый белок или молекула дцРНК экспрессировались под контролем отдельного промотора, или в определенной их комбинации. Белки согласно данного изобретения могут быть экспрессированы из мультигенной системы экспрессии, в которой один или более белков TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL экспрессируются из общего нуклеотидного сегмента, который также содержит другие открытые рамки считывания и промоторы, в зависимости от выбранного типа системы экспрессии. Например, бактериальная мультигенная система экспрессии может использовать единственный промотор для управления экспрессией многократно связанных/тандемных открытых рамок считывания в пределах одного оперона (то есть, полицистронная экспрессия). В другом примере мультигенная система экспрессии растений может использовать многократно несвязанные или связанные экспрессионные кассеты, каждая кассета экспрессирует другой белок или другой агент, такой как одна или более молекул дцРНК.

Рекомбинантные полинуклеотиды или конструкции рекомбинантной ДНК, содержащие последовательность, кодирующую белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, могут быть доставлены в клетки-хозяева с помощью векторов, например плазмидой, бакуловирусом, синтетической хромосомой, вирионом, космидой, фагмидой, фагом или вирусным вектором. Такие векторы могут быть использованы для достижения стабильной или транзientной экспрессии последовательности, кодирующей белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL в клетке-хозяине, или последующей экспрессии кодируемого полипептида. Экзогенный рекомбинантный полинуклеотид или конструкция рекомбинантной ДНК, которая содержит последовательность, кодирующую белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL и которая вводится в клетку-хозяина, упоминается в данном документе как "трансген".

В данном документе представлены трансгенные бактерии, трансгенные клетки растений, трансгенные растения и части трансгенных растений, которые содержат рекомбинантный полинуклеотид, экспрессирующий любую одну или более из последовательности, кодирующей TIC6757 или белок-токсин родственного семейства. Термин "бактериальная клетка" или "бактерия" может включать, но без ограничений, клетку *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia* или *Rhizobium*. Термин "клетка растения" или "растение" может включать, но без ограничений, двудольное или однодольное растение. Термин "клетка растения" или "растение" может включать, но без ограничений, клетку или растение люцерны, банана, ячменя, бобов, брокколи, капусты, Brassica, моркови, маниоки, клешевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокосовой пальмы, кофе, кукурузы, клевера, хлопчатника, тыквенных, огурца, Дугласовой пихты, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата-латука, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливы, лука, декоративного растения, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубиного гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневищных злаков, ржи, американского шафрана, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза и пшеницы. В некоторых вариантах реализации изобретения представлены трансгенные растения и части трансгенных растений, которые регенерировали из трансгенной растительной клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения трансгенные растения могут быть получены из трансгенного семени путем разрезания, срывания, измельчения или иного отделения части от растения. В определенных вариантах реализации изобретения часть растения может быть семенем, коробочкой, листом, цветком, стеблем, корнем или любой его частью или нерегенерируемой частью трансгенной части растения. Как используется в данном контексте, "нерегенерируемая" часть трансгенной части растения представляет собой часть, которая не может быть индуцирована для образования целого растения или которая не может быть индуцирована для образования целого растения, способного к половому и/или бесполому размножению. В некоторых вариантах реализации изобретения нерегенерируемая часть отбираемой части растения представляет собой часть трансгенного семени, коробочки, листа, цветка, стебля или корня.

Приведены способы получения трансгенных растений, которые содержат ингибирующее в отношении насекомых отряда чешуекрылых количество белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Такие растения могут быть получены путем введения рекомбинантного полинуклеотида, который кодирует любой из белков, предложенных в данной заявке, в растительной клетке, и выбора растения, полученного из указанной растительной клетки, которая экспрессирует ингибирующее в отношении насекомых отряда чешуекрылых количество белков. Растения могут быть получены из растительных клеток путем регенерации, из семян, пыльцы или меристемы, полученных способами трансформации. Способы трансформации растений известны в данной области техники.

Обработанные растительные продукты, причем процессированный продукт содержит обнаруживаемое количество белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, сегменты и фрагменты, обладающие ингибиторной активностью в отношении насекомых, или его фрагмент или любую его отличительную часть, также описаны в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения обработанный продукт выбирают из группы, состоящей из частей растения, биомассы растений, масла, муки, сахара, корма для животных, муки, хлопьев, отрубей, пуха, кожуры, обработанных семян и семян. В определенных вариантах реализации изобретения обработанный продукт является нерегенерируемым. Растительный продукт может включать товар или другие коммерческие продукты, полученные из трансгенного растения или части трансгенных растений, причем товар или другие продукты можно отследить путем выявления нуклеотидных сегментов или экспрессированных РНК или белков, которые кодируют или содержат отличающиеся части белка TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL.

Растения, экспрессирующие белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, можно скрещивать путем селекции с трансгенными объектами, экспрессирующими другие белки-токсины и/или экспрессирующими другие трансгенные признаки, такие как гены устойчивости к гербицидам, гены, повышающие урожайность или устойчивость к стрессу, и тому подобное, или признаки могут быть объединены в одном векторе, так что все признаки будут связаны между собой.

Как дополнительно описано в примерах, последовательности, кодирующие белок TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, и последовательности, имеющие значительную процентную идентичность с TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, могут быть идентифицированы с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), термическая амплификация и гибридизация. Например, белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL могут быть использованы для получения антител, которые специфически связываются с подобными белками, и могут быть использованы для скрининга и поиска других тесно связанных белков.

Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие белки-токсины TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 и TIC7473PL, могут быть использованы в качестве зондов и праймеров для скрининга и идентификации других членов класса с использованием способов термоциклической или изотермической амплификации и гибридизации. Например, олигонуклеотиды, полученные из последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, могут быть использованы для определения присутствия или отсутствия трансгена TIC6757PL, TIC7472PL или TIC7473PL в образце дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученной из товарного продукта. Учитывая чувствительность определенных способов обнаружения нуклеиновых кислот, которые используют олигонуклеотиды, предполагается, что олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17, могут быть использованы для выявления трансгена TIC6757PL, TIC7472PL и TIC7473PL в товарных продуктах, полученных из объединенных источников, где только часть товарного продукта получена из трансгенного растения, содержащего любой из трансгенов. Кроме того, признано, что такие олигонуклеотиды могут быть использованы для введения изменения последовательности нуклеотидов в каждой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17. Такие "мутагенезные" олигонуклеотиды полезны для идентификации вариантов аминокислотной последовательности TIC6757PL, TIC7472PL и TIC7473PL, проявляющих диапазон ингибирующей активности в отношении насекомых или различную экспрессию в клетках-хозяевах трансгенного растения.

Гомологи нуклеотидной последовательности, например инсектицидные белки, кодируемые нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с каждой или любой из последовательностей, описанных в данной заявке в жестких условиях гибридизации, также являются вариантом реализации данного изобретения. Изобретение также относится к способу обнаружения первой нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется со второй нуклеотидной последовательностью, при этом первая нуклеотидная последовательность (или ее обратная комплементарная последовательность) кодирует пестицидный белок или его пестицидный фрагмент и гибридизуется со второй нуклеотидной последовательностью. В таком случае вторая нуклеотидная последовательность может быть любой из нуклеотидных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 в жестких условиях гибридизации. Кодирующие нуклеотидные последовательности гибридизуются друг с другом в соответствующих условиях гибридизации, таких как жесткие условия гибридизации, а белки, кодируемые этими нуклеотидными последовательностями, перекрестно реагируют с антисывороткой к любому из других белков. Жесткие условия гибридизации, как определено в данном документе, включают в себя по меньшей мере гибридизацию при 42°C с последующими двумя промывками в течение пяти минут каждая при комнатной температуре с 2X SSC, 0,1% ДСН, с последующими двумя промывками в течение 30 мин каждая при 65°C в 0,5X SSC, 0,1% ДСН. Промывки при еще более высоких температурах представляют собой еще более жесткие условия, например, условия гибридизации 68°C с последующим промыванием при 68°C в 2 X SSC, содержащем 0,1% ДСН.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что из-за вырожденности генетического кода многие другие последовательности способны кодировать такие подобные белки, и эти последовательности в той степени, в которой они функционируют для экспрессии пестицидных белков либо в штаммах *Bacillus* или в растительных клетках являются вариантами реализации настоящего изобретения, подразумевая, конечно, что многие такие вырожденные кодирующие последовательности не будут гибридизоваться в этих условиях с нативными последовательностями *Bacillus* или *Paenibacillus*, кодирующими TIC6757, TIC7472 или TIC7473. Данная заявка рассматривает применение этих и других способов идентификации, известных специалистам в данной области техники, для идентификации последовательностей, кодирующих белок TIC6757, TIC7472 и TIC7473 и последовательностей, имеющих значительную процентную идентичность с последовательностями, кодирующими белок TIC6757, TIC7472 и TIC7473.

В этом описании также рассматривается применение молекулярных методов, известных в данной области техники, для разработки и клонирования коммерчески полезных белков, содержащих химеры белков из пестицидных белков; например, химеры могут быть собраны из сегментов белков TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL для получения дополнительных полезных вариантов реализации изобретения, включая сборку сегментов TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL с сегментами различных белков, отличными от TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL и родственных белков. Белки TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL могут быть подвергнуты выравниванию друг с другом и с другими (белками) *Bacillus*, *Paenibacillus* или другими пестицидными белками (независимо

от того, являются ли они филогенетически в дальнем или близком родстве), и могут быть идентифицированы сегменты каждого такого белка, которые могут быть использованы для замещения между выровненными белками, в результате чего образуются химерные белки. Такие химерные белки могут быть подвергнуты биологическому анализу на вредителях и охарактеризованы на наличие или отсутствие повышенной биологической активности или расширенного спектра целевых вредителей по сравнению с исходными белками, из которых был получен каждый такой сегмент в химере. Пестицидная активность полипептидов может быть дополнительно спроектирована для активности к конкретному вредителю или более широкому спектру вредителей путем замены доменов или сегментов другими белками или с использованием методов направленного развития, известных в данной области техники.

Также в данной заявке раскрыты способы борьбы с насекомыми, в частности поражениями культурных растений насекомыми отряда чешуекрылых с использованием белков TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Такие способы могут включать в себя выращивание растения, содержащего ингибирующее в отношении насекомых отряда чешуекрылых количество белка-токсина TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. В некоторых вариантах реализации изобретения такие способы могут дополнительно включать любое одно или более из: (i) нанесения любой композиции, содержащей или кодирующей белок-токсин TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, на растение или семя, которое дает начало растению; и (ii) трансформацию растения или клетки растения, которая дает начало растению, полинуклеотидом, кодирующим белок-токсин TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. В общем, предполагается, что белок-токсин TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL может быть обеспечен в композиции, в микроорганизме, или в трансгенном растении, чтобы обеспечить ингибирующую активность по отношению к насекомым отряда чешуекрылых.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты белков-токсинов TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL является инсектицидно активным ингредиентом композиции, обладающей ингибирующей активностью в отношении насекомых, полученной культивированием рекомбинантной клетки *Bacillus* или любой другой рекомбинантной бактериальной клетки, трансформированной с целью экспрессии белка-токсина TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL в условиях, подходящих для экспрессии белка-токсина TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Такая композиция может быть получена путем высушивания, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, седиментации или концентрирования культуры таких рекомбинантных клеток, экспрессирующих/продуцирующих указанный рекомбинантный полипептид. 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 таким образом произведенный рекомбинантный полипептид, создают композицию, которая содержит рекомбинантный полипептид, может содержать бактериальные клетки, бактериальные споры, а также параспоральные тельца и может поставляться для различных применений, включая продукты-спреи, обладающие ингибирующей активностью в отношении сельскохозяйственных насекомых, или препараты кормовой биомассы, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых в кормовых биологических тестах.

В одном варианте реализации изобретения для снижения вероятности развития резистентности, композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащая TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL, может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полипептид, который проявляет ингибирующую активность против тех же видов насекомых отряда чешуекрылых, но который отличается от белка-токсина TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL. Возможные дополнительные полипептиды для такой композиции содержат белок, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых и молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых. Один из примеров использования таких рибонуклеотидных последовательностей для борьбы с насекомыми-вредителями описан в Ваум, и соавт. (публикация патента США 2006/0021087 A1). Такой дополнительный полипептид для борьбы с вредителями отряда чешуекрылых может быть выбран из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, такого как, без ограничений, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A. 105, Cry1Ae, Cry1B (публикация патента США №10/525,318), Cry1C (патент США № 6,033,874), Cry1D, Cry1Da и их вариантов, Cry1E, Cry1F и химер Cry1A/F (патенты США № 7070982; 6962705 и 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, химеры типа Cry1, такие как, но без ограничений, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 и TIC1100 (публикация международной заявки WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (публикация международной заявки WO 2016/061392(A2)), 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 (публикация патента США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (публикация патента США 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (публикация патента

США 2013-0104259 A1), АХМІ-134 (публикация патента США 2013-0167264 A1), АХМІ-150 (публикация патента США 2010-0160231 A1), АХМІ-184 (публикация патента США 2010-0004176 A1), АХМІ-196, АХМІ-204, АХМІ-207, АХМІ-209 (публикация патента США 2011-0030096 A1), АХМІ-218, АХМІ-220 (публикация патента США 2014-0245491 A1), АХМІ-221z, АХМІ-222z, АХМІ-223z, АХМІ-224z, АХМІ-225z (публикация патента США 2014-0196175 A1), АХМІ-238 (публикация патента США 2014-0033363 A1), АХМІ-270 (публикация патента США 2014-0223598 A1), АХМІ-345 (публикация патента США 2014-0373195 A1), АХМІ-335 (международная публикация заявки WO2013/134523 (A2)), DIG-3 (публикация патента США 2013-0219570 A1), DIG-5 (публикация патента США 2010-0317569 A1), DIG-11 (публикация патента США 2010-0319093 A1), AfIP-1A и его производные (публикация патента США 2014-0033361 A1), AfIP-1B и его производные (публикация патента США 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (публикация патента США 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (публикация патента США 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (публикация патента США 2014-0007292 A1), Pput_1063 (публикация патента США 2014-0007292 A1), DIG-657 (международная публикация заявки WO2015/195594 A2), Pput 1064 (публикация патента США 2014-0007292 A1), GS-135 и его производные (публикация патента США 2012-0233726 A1), GS153 и его производные (публикация патента США 2012-0192310 A1), GS154 и его производные (публикация патента США 2012-0192310 A1), GS155 и его производные (публикация патента США 2012-0192310 A1), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2012-0167259 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2012-0047606 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2011-0154536 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2011-0112013 A1, SEQ ID NO: 2 и 4, и их производные, как описано в публикации патента США 2010-0192256 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2010-0077507 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2010-0077508 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2009-0313721 A1, SEQ ID NO: 2 или 4, и их производные, как описано в публикации патента США 2010-0269221 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США № 7772465 (B2), CF161_0085 и его производные, как описано в WO 2014/008054 A2, токсичные к чешуекрылым белки и их производные, как описано в публикациях патентов США US 2008-0172762 A1, US 2011-0055968 A1 и US 2012-0117690 A1; SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в US 7510878 (B2), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США № 7812129 (B1); и тому подобное.

В других вариантах реализации изобретения такая композиция/препарат может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полипептид, который проявляет ингибирующую активность в отношении насекомых-вредителей, которые не ингибируются белком данного изобретения, в прочих случаях, обладающим ингибирующей активностью против насекомых, с тем чтобы расширить спектр ингибирующей активности в отношении насекомых. Например, для борьбы с вредителями отряда полужесткокрылых, комбинации белков данного изобретения, проявляющих ингибирующую активность по отношению к насекомым, могут быть применены с активными по отношению к отряду полужесткокрылых белками, такими как TIC1415 (публикация патента США 2013-0097735 A1), TIC807 (патент США № 8609936), TIC834 (публикация патента США 2013-0269060 A1), АХМІ-036 (публикация патента США 2010-0137216 A1) и АХМІ-171 (публикация патента США 2013-0055469 A1). Дополнительно полипептид для борьбы с вредителями отряда жесткокрылых может быть выбран из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, такого как, без ограничений, Cry3Bb (публикация патента США № 6,501,009), варианты Cry1C, варианты Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, АХМІ134 (публикация патента США 2013-0167264 A1), АХМІ-184 (публикация патента США 2010-0004176 A1), АХМІ-205 (публикация патента США 2014-0298538 A1), АХМІ-207 (публикация патента США 2013-0303440 A1), АХМІ-218, АХМІ-220 (публикация патента США 20140245491A1), АХМІ-221z, АХМІ-223z (публикация патента США 2014-0196175 A1), АХМІ-279 (публикация патента США 2014-0223599 A1), АХМІ-R1 и его варианты (публикация патента США 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (публикация патента США 2010-0319092 A1), eNIPs (публикация заявки на патент США № 2010/0017914), IP3 и его варианты (публикация патента США 2012-0210462 A1) и ϕ -Hexatoxin-Hv1a (публикация заявки на патент США US2014-0366227 A1).

Дополнительные полипептиды для борьбы с насекомыми-вредителями отрядов жесткокрылых, чешуекрылых и полужесткокрылых можно найти на сайте номенклатуры токсина *Bacillus thuringiensis* поддерживаемом Neil Crickmore (во всемирной паутине по адресу btomenclature.info).

Способность насекомых развивать устойчивость к определенным инсектицидам была описана в данной области техники. Одна стратегия управления устойчивостью насекомых заключается в использовании трансгенных культур, которые экспрессируют два различных вещества, обладающих ингибирующей активностью против насекомых, которые действуют через различные механизмы действия. Таким образом, любые насекомые с устойчивостью к одному из веществ, обладающих ингибирующей активностью против насекомых, могут контролироваться с помощью другого вещества, обладающего ингибирующей активностью против насекомых. Другая стратегия борьбы с устойчивостью насекомых состоит в

применении растений, которые не защищены от целевых видов насекомых отряда чешуекрылых, с целью обеспечения укрытия для таких незащищенных растений. Один конкретный пример описан в патенте США № 6551962, полное содержание которого включено посредством ссылки.

Другие варианты реализации изобретения, такие как местно применяемые пестицидные химикаты, которые разработаны для борьбы с вредителями, которые также регулируются белками, описанными в данном документе, для применения с белками в препаратах для обработки семян, опыления, точечного полива или протирания, и которые могут быть нанесены непосредственно на почву (поливка почвы), нанесены на выращиваемые растения, экспрессирующие белки, описанные в данном документе, или приготовлены для нанесения на семена, содержащие один или более трансгенов, кодирующих один или более описанных белков. Такие препараты для применения при обработке семян можно наносить с помощью различных наклеек и липких веществ, известных в данной области техники. Такие препараты могут содержать пестициды, которые являются синергичными в способе действия с описанными белками, так что пестициды препарата действуют посредством другого способа действия для борьбы с теми же или похожими вредителями, которые могут регулироваться описанными белками, или что такие пестициды действуют для борьбы с вредителями в более широком диапазоне хозяев или видов вредителей растений, которые неэффективно регулируются пестицидными белками TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 или TIC7473PL.

Вышеупомянутая композиция/препарат может дополнительно содержать сельскохозяйственно приемлемый носитель, такой как приманка, порошок, dust, таблетки, гранулы, спреи, эмульсия, коллоидная суспензия, водный раствор, препараты спор/кристаллов *Bacillus*, средство для обработки семян, рекомбинантная растительная клетка/растительная ткань/семена/растение, трансформированная для экспрессии одного или более белков, или бактерия, трансформированная для экспрессии одного или более белков. В зависимости от уровня ингибирования в отношении насекомых или инсектицидного ингибирования, присущего рекомбинантному полипептиду, и уровня препарата, который должен применяться в анализе растений или рациона, композиция/препарат могут содержать различные массовые количества рекомбинантного полипептида, например от 0,0001 до 0,001%, до 0,01, до 1, до 99% от массы рекомбинантного полипептида.

Ввиду вышеизложенного специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны изменения в конкретных описанных аспектах и все же будет получен подобный или аналогичный результат, не отходя от сущности и объема изобретения. Таким образом, конкретные структурные и функциональные детали, описанные в данном документе, не должны интерпретироваться как ограничивающие. Следует понимать, что полное раскрытие каждой из указанных выше публикаций включено в описание данной заявки.

Примеры

Пример 1. Обнаружение, клонирование и экспрессия TIC6757

Последовательности, кодирующие три новых пестицидных белка *Paenibacillus popilliae* были идентифицированы, клонированы, подтверждены и протестированы в биологическом анализе с использованием насекомых. Пестицидные белки TIC6757, TIC7472 и TIC7473, выделенные из штаммов DSC004343, DSC007648 и DSC008493 *Paenibacillus popilliae*, соответственно, представляют собой новые Vip3C-подобные белки. Последовательности, состоящие в дальнем родстве с TIC6757, TIC7472 и TIC7473 представляют собой Vip3Ca2 (при идентичности 83,7%, ближайший известный родственник), Vip3Aa1 (идентичность 66,75%) и Vip3B-подобный белок (идентичность 60,93%). Отличительное и уникальное качество TIC6757, TIC7472 и TIC7473 указывает на то, что эти пестицидные белки, вероятно, имеют новый способ действия (СД).

Праймеры полимеразной цепной реакции (ПЦР) были разработаны для амплификации полноразмерной копии кодирующей области TIC6757, TIC7472 и TIC7473 из геномной ДНК, выделенной из штаммов DSC004343, DSC007648 и DSC008493 *Paenibacillus popilliae*, соответственно. ПЦР-ампликоны также включали в себя кодоны инициации и терминации трансляции каждой кодирующей последовательности.

Каждый из ампликонов клонировали с использованием способов, известных в данной области техники, в два разных экспрессионных вектора Vt в функциональной связи с экспрессируемым промотором Vt. Один экспрессионный вектор Vt содержал промотор, который был активным во время споруляции бациллы. Другой экспрессионный вектор содержал промотор останавливающий спорообразование. Кроме того, каждый из ампликонов клонировали в вектор, используемый для экспрессии белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Для выделения экспрессированных белков *E. coli*, гистидиновую метку функционально связывали с экспрессируемыми кодирующими последовательностями для облегчения очистки белка с помощью колонки. Кодирующие последовательности и их соответствующие белковые последовательности, используемые для экспрессии в бактериях, представлены в табл. 3 ниже.

Таблица 3. Последовательности, кодирующие токсин и соответствующие последовательности белка, используемые для экспрессии в *Bt* и *E. coli*.

Токсин	Кодирующая последовательность ДНК SEQ ID NO:	Белковая последовательность SEQ ID NO:	Бактериальный хозяин экспрессии
TIC6757	1	2	<i>Bt</i>
TIC7472	7	8	<i>Bt</i>
TIC7473	11	12	<i>Bt</i>
TIC6757 His	5	6	<i>E. coli</i>
TIC7472 His	9	10	<i>E. coli</i>
TIC7473 His	13	14	<i>E. coli</i>

Пример 2.

TIC6757, TIC7472 и TIC7473 демонстрируют активность, по отношению к представителям отряда чешуекрылых в биологическом анализе с использованием насекомых.

Пестицидные белки TIC6757, TIC7472 и TIC7473 экспрессировали в *Bt* и *E. coli* и анализировали на токсичность по отношению к различным видам отряда чешуекрылых, жесткокрылых и полужесткокрылых. Препараты каждого токсина из *Bt* анализировали против видов отряда чешуекрылых совки помидорной (BAW, *Spodoptera exigua*), совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), совки хлопковой американской (CLW, *Alabama argillacea*), капустной моли (DBM, *Plutella xylostella*), мотылька стеблевого кукурузного (ECB, *Ostrinia nubilalis*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), кукурузной листовой совки, устойчивой к Cry1Fa1 (FAWR1, *Spodoptera frugiperda*), совки американской (AWB, *Helicoverpa armigera*), розового коробочного червя (PBW, *Pectinophora gossypiella*), южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), совки пятнистой (SBW, *Earias vittella*), огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*), табачной листоверки (TBW, *Heliothis virescens*), табачной совки (TCW, *Spodoptera litura*, также известной как табачный озимый червь) и совки бархатных бобов (VBW, *Anticarsia gemmatalis*); видов отряда жесткокрылых колорадского жука (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*), западного кукурузного жука (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); и видов отряда полужесткокрылых клопа травяного (TPB, *Lygus lineolaris*), слепняка западного матового (WTP, *Lygus hesperus*), клопа коричневого вонючего (NBSB, *Euschistus heros*) и щитника овощного зеленого (GSB, *Nezara viridula*).

Биологическую активность пестицидных белков TIC6757, TIC7472 и TIC7473 оценивали путем производства белка в хозяевах экспрессии *E. coli* или *Bt*. В случае хозяина *Bt* штамм *Bt*, экспрессирующий TIC6757, TIC7472 или TIC7473, выращивали в течение двадцати четырех (24) часов, а затем культуру добавляли к рациону насекомых. Смертность и задержку роста оценивали путем сравнения роста и развития насекомых на диете с культурой из штамма *Bt*, экспрессирующего TIC6757, TIC7472 или TIC7473 с насекомым на диете с контрольной культурой. Штаммы *E. coli*, экспрессирующие TIC6757, TIC7472 или TIC7473, обрабатывались аналогичным образом и также были представлены в рационе насекомых. Активность в биологическом анализе, наблюдаемая для каждого белка из препарата *Bt* или *E. coli* или обоих препаратов представлена в табл. 4 и 5 ниже, при этом "+" указывает на активность, а "НТ" указывает, что токсин не анализировался против этого конкретного вредителя насекомых.

Таблица 4. Активность в биологическом анализе TIC6757, TIC7472 и TIC7473 против насекомых-вредителей

Токсин	BAW	BCW	CEW	CLW	DBM	ECB	FAW	FAWR1	AWB	PBW	SAW	SBL
TIC6757	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC7472	НТ	НТ	+	НТ	НТ	НТ	+	НТ	НТ	НТ	+	+
TIC7473	НТ	НТ	+	НТ	НТ	НТ	+	НТ	НТ	НТ	+	+

Таблица 5. Активность в биологическом анализе TIC6757, TIC7472 и TIC7473 против насекомых-вредителей.

Токсин	SBW	SWCB	TBW	TCW	VBC	CPB	WCR	TPB	WTP	NBSB	GSB
TIC6757	+	+	+	+	+						
TIC7472	НТ	+		НТ	НТ		НТ			НТ	НТ
TIC7473	НТ	+		НТ	НТ		НТ			НТ	НТ

Как можно видеть в табл. 4 и 5 выше, токсин TIC6757 продемонстрировал активность против многих насекомых-вредителей отряда чешуекрылых (BAW, BCW, CEW, CLW, DBM, ECB, FAW, FAWR1, AWB, SAW, SBL, SBW, SWCB, TBW, TCW и VBC). Активность наблюдалась для большинства вредителей, проверенных к TIC7472 и TIC7473 (CEW, FAW, SAW, SBL, SWCB).

Пример 3. Анализ активности TIC6757PL по отношению к вредителям отряда чешуекрылых в стабильно трансформированных растениях кукурузы

Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, сконструированные для экспрессии как нацеленного, так и не нацеленного на пластыды пестицидного белка TIC6757PL, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовались для стабильной трансформации растений кукурузы. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биологическом анализе с использованием насекомых против различных насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Синтетические кодирующие последовательности были сконструированы для применения в экс-

прессии закодированного в них белка в растениях, клонированы в бинарный вектор для трансформации растения и использовались для трансформации растительных клеток кукурузы. Синтетические последовательности синтезировали в соответствии со способами, в целом описанными в патенте США 5,500,365, для избегания некоторых неподходящих проблемных последовательностей, таких как последовательности полиаденилирования растений, обогащенные АТТТА и А/Т, и в то же время сохраняли аминокислотную последовательность нативного белка Paenibacillus. Синтетические кодирующие последовательности кодировали белок TIC6757PL, который содержит дополнительный остаток аланина непосредственно после иницирующего метионина по сравнению с белком TIC6757. Для белка, нацеленного на пластиды, синтетическую последовательность, кодирующую пестицидный белок TIC6757PL, функционально связывали с сохранением рамки считывания с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, для доставки в хлоропласты. Полученные векторы трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC6757PL, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидерной последовательностью, функционально связанный 5' с интроном, функционально связанный 5' с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный или не нацеленный на пластиды белок TIC6757PL, который, в свою очередь, функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью; и вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием глифосата. Синтетическая кодирующая последовательность для пестицидного белка TIC6757PL представлена в виде SEQ ID NO: 3 и кодирует белок, представленный в виде SEQ ID NO: 4.

Растения кукурузы трансформировали четырьмя различными бинарными трансформационными векторами, как описано выше, с применением способа трансформации, опосредованной Agrobacterium. Бинарный вектор трансформации растений конструкции 1 и 3 содержит кодирующую последовательность, кодирующую нацеленный на пластиды белок TIC6757PL, тогда как конструкции 2 и 4 содержат кодирующую последовательность, кодирующую не нацеленный на пластиды белок TIC6757PL. Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биологический анализ с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Одну свежесобранную личинку возрастом менее одного дня помещали на каждый образец листового диска и ей позволяли кормиться в течение примерно четырех дней. Ткань, полученную из нетрансформированного растения кукурузы, использовали в качестве отрицательного контроля. Множество R₀ объектов произошедших трансформаций с однокопийной вставкой для каждого бинарного вектора оценивали против совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

Трансформированные растения R₀, экспрессирующие TIC6757PL, были очень эффективными (определялись как имеющие повреждения листьев менее или равное 17,5% со стопроцентной смертностью) против всех четырех насекомых-вредителей, как показано в табл. 6. Высокая пенетрантность (обозначенная буквой "(B)") определялась как пенетрантность более пятидесяти процентов анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 17,5% со стопроцентной смертностью. Низкая пенетрантность (обозначенная буквой "(H)") определялась как пенетрантность менее или равная пятидесяти процентов анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 17,5% со стопроцентной смертностью.

Таблица 6. Количество объектов, экспрессирующих TIC6757 с повреждением листьев ≤ 17,5% со стопроцентной смертностью и пенетрантность.

Конструкция	Общее число объектов	Количество объектов с повреждением листьев ≤17,5% и 100% смертностью (пенетрантность) .			
		BCW	CEW	FAW	SWC
Конструкция 1	22	17 (B)	18 (B)	18 (B)	11 (H)
Конструкция 2	20	14 (B)	14 (B)	14 (B)	4 (H)
Конструкция 3	19	17 (B)	17 (B)	17 (B)	17 (B)
Конструкция 4	20	16 (B)	16 (B)	15 (B)	7 (H)

Выбранным объектам R₀, полученным из R₀ Конструкции 1 (нацеленной на пластиды) и Конструкции 2 (не нацеленной на пластиды) было разрешено самоопыляться, давая потомство F₁. Несколько гетерозиготных растений потомков F₁ из каждого объекта R₀ были выбраны для биологического анализа листового диска и проанализированы против совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*). В табл. 7 ниже показано среднее процентное повреждение листьев и средняя смертность для каждого растения, полученного от каждой конструкции/объекта. Потомство растений F₁ оценивалось с учетом объекта R₀. Например, "Объект-1_1" является первым гетерозиготным растением потомства F₁, полученным из Объекта-1, а "Объект-1_2" является первым гетерозиготным растением потомства F₁, полученным из Объекта-1. "N" представляет количест-

во образцов с каждого растения, используемого в анализе. Как видно из табл. 7 и 8, большинство растений, полученных из каждого объекта R_0 , демонстрировали не более 5% повреждения листьев и стопроцентную смертность по отношению к BCW, CEW и FAW. Что касается SWCB, многие растения, полученные из каждого объекта R_0 , демонстрировали менее 10% повреждения листьев и более 50% смертности в анализе.

Таблица 7. Средний процент повреждения листьев и смертность в потомстве F_1 , полученном из выбранных объектов R_0 , экспрессирующих TIC6757PL

Конструкция	Объект_Растение	N	BCW		CEW	
			Средний % повреждения листьев	Средняя смертность	Средний % повреждения листьев	Средняя смертность
Конструкция 1	Объект-1_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 1	Объект-1_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 1	Объект-1_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 1	Объект-1_4	3	5,00	100,00	6,65	100,00
Конструкция 1	Объект-2_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 1	Объект-2_2	3	НТ	НТ	7,50	100,00
Конструкция 1	Объект-2_3	3	НТ	НТ	8,35	100,00
Конструкция 2	Объект-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-3_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_3	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_4	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_5	3	20,00	33,33	10,00	100,00
Конструкция 2	Объект-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-5_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-5_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
НЕТ	Отрицательный контроль	3	55,00	0,00	55,00	0,00

Таблица 8. Средний процент повреждения листьев и смертность в потомстве F_1 , полученном из выбранных объектов R_0 , экспрессирующих TIC6757PL

Конструкция	Объект_Растение	N	FAW		SWCB	
			Средний % повреждения листьев	Средняя смертность	Средний % повреждения листьев	Средняя смертность
Конструкция 1	Объект-1_1	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Конструкция 1	Объект-1_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Конструкция 1	Объект-1_3	3	5,00	100,00	7,50	50,00
Конструкция 1	Объект-1_4	3	5,00	100,00	8,35	66,67
Конструкция 1	Объект-2_1	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Конструкция 1	Объект-2_2	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Конструкция 1	Объект-2_3	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Конструкция 2	Объект-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-3_2	3	5,00	100,00	15,00	50,00
Конструкция 2	Объект-4_1	3	5,00	100,00	12,50	0,00
Конструкция 2	Объект-4_2	3	5,00	100,00	40,00	100,00
Конструкция 2	Объект-4_3	3	5,00	100,00	48,35	0,00
Конструкция 2	Объект-4_4	3	5,00	100,00	55,00	0,00
Конструкция 2	Объект-4_5	3	5,00	100,00	55,00	0,00
Конструкция 2	Объект-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Конструкция 2	Объект-5_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Конструкция 2	Объект-5_3	3	5,00	100,00	8,35	0,00
НЕТ	Отрицательный контроль	3	55,00	0,00	51,65	0,00

Выбранным объектам R_0 , полученным из конструкции 3 (нацеленной на пластиды) и Конструкции 4 (не нацеленной) было разрешено самоопыляться, давая потомство F_1 . Гетерозиготные растения потомки F_1 из каждого объекта R_0 были выбраны для биологического анализа листового диска и проанализированы против совки бобовой западной (WBC, *Striacosta albicosta*). В табл. 9 показан средний процент повреждения листьев и средний процент смертности растения потомка F_1 из каждого объекта R_0 и отрицательный контроль. "N" представляет количество образцов с каждого растения, используемого в анализе.

Таблица 9. Средний процент повреждения листьев и средний процент смертности в потомстве F_1 , полученном из выбранных объектов R_0 , экспрессирующих TIC6757PL

Конструкция	Объект	N	Средний % повреждения листьев	Средняя смертность
Конструкция 3	Объект-6 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-7 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-8 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-9 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-10 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-11 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-12 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-13 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-14 1	4	5,00	100,00
Конструкция 3	Объект-15 1	4	27,50	50,00
Конструкция 4	Объект-16 1	4	5,00	100,00
Конструкция 4	Объект-17 1	4	5,00	100,00
Конструкция 4	Объект-18 1	4	5,00	100,00
Отрицательный контроль		4	45,00	0,00

Как можно видеть в табл. 9 выше, все, кроме одного растения потомства F_1 , из каждого объекта R_0 , проанализированного против WBC, продемонстрировали не более 5% повреждения листьев и стопроцентную смертность.

Саженьцы, полученные из отобранных гетерозиготных растений потомков F_1 , трансформированных конструкцией 3 (нацеленной на пластиды) и конструкцией 4 (не нацеленной), анализировали на устойчивость к совке-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*). Семена потомства F_1 , а также нетрансформированные семена (отрицательный контроль) были посажены в горшки. Через восемь дней, когда саженцы появлялись из почвы, каждое растение было заражено тремя личинками третьего возраста BCW. Через 14 дней после заражения растения были проверены с целью подсчета количества растений, которые были поражены BCW. В анализе использовали шестьдесят восемь растений потомков F_1 , полученных из десяти различных объектов R_0 , трансформированных конструкцией 3 и десяти растений потомков F_1 , полученных из четырех различных объектов R_0 , трансформированных конструкцией 4. Также в анализе использовались 15 растений в качестве отрицательного контроля. После осмотра растений было обнаружено, что 80% отрицательных контролей были поражены BCW, тогда как нулевой процент растений потомков F_1 , трансформированных либо конструкцией 3, либо конструкцией 4, продемонстрировал поражение растения.

Вышеизложенное демонстрирует, что трансформированные растения кукурузы, экспрессирующие TIC6757PL, обеспечивают превосходную устойчивость к насекомым-вредителям отряда чешуекрылых, в частности совке-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совке (*Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совке (*Spodoptera frugiperda*), огневке кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*) и совке бобовой западной (*Striacosta albicosta*).

Пример 4. Анализ активности TIC6757PL по отношению к вредителям отряда чешуекрылых в стабильно трансформированных растениях сои

Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, сконструированные для экспрессии как нацеленного, так и не нацеленного на пластиды пестицидного белка TIC6757PL, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовались для стабильной трансформации растений сои. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биологическом анализе с использованием насекомых против различных насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Синтетическая кодирующая последовательность, сконструированная для экспрессии в растениях, как описано в примере 3 выше, была клонирована в бинарные векторы для трансформации растений и использована для трансформации клеток растения сои. Бинарные векторы, содержащие нацеленные и не нацеленные на пластиды кодирующие последовательности TIC6757PL, были сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC6757PL, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидерной последовательностью, функционально связанный 5' с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный или не нацеленный на пластиды белок TIC6757PL, который, в свою очередь, функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью и; вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием спектиномицина. Конструкции 1, 3 и 5 содержат кодирующую последовательность, которая кодирует не нацеленный пестицидный белок TIC6757PL. Конструкции 2, 4 и 6 содержат кодирующую последовательность, которая кодирует нацеленный на пластиды белок TIC6757PL.

Трансформированные клетки сои индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биологический анализ с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из не-

трансформированного растения сои, использовали в качестве отрицательного контроля. Множественные объекты трансформации от каждого бинарного вектора оценивались против южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) и американской кукурузной совки (SPW, *Helicoverpa zea*).

Трансформированные растения сои R₀, экспрессирующие TIC6757PL, были очень эффективными (определялись как имеющие повреждения листьев менее или равное 20%) против SAW, SBL и SPW, как показано в табл. 10. Высокая пенетрантность (обозначенная буквой "(B)") определялась как пенетрантность более пятидесяти процентов анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 20%. Низкая пенетрантность (обозначенная буквой "(H)") определялась как пенетрантность менее или равная пятидесяти процентов анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 20%.

Таблица 10. Количество объектов, экспрессирующих TIC6757PL с повреждением листьев и пенетрантностью ≤20%

Конструкция	Общее число объектов	Количество объектов с повреждением листьев (пенетрантностью) ≤20%.		
		SAW	SBL	SPW
Конструкция 1	15	14 (B)	14 (B)	12 (B)
Конструкция 2	15	5 (H)	3 (H)	8 (B)
Конструкция 3	15	12 (B)	13 (B)	13 (B)
Конструкция 4	15	15 (B)	15 (B)	15 (B)
Конструкция 5	15	14 (B)	13 (B)	14 (B)
Конструкция 6	15	15 (B)	15 (B)	15 (B)

Выбранным трансгенным растениям сои R₀, экспрессирующим белковый токсин TIC6757PL, полученный из трансформации конструкциями 3, 4, 5 и 6, было разрешено самоопыляться, давая семена R₁. Семенам R₁ дали возможность прорасти, для получения растений R₁. Растения R₁, гомозиготные по экспрессионной кассете TIC6757PL, были выбраны для биологического анализа листового диска против южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), американской кукурузной совки (SPW, *Helicoverpa zea*) и совки бархатных бобов (VBW, *Anticarsia gemmatalis*). В табл. 11 и 12 показан средний процент повреждения листьев, показанный каждым насекомым для каждого растения потомства R₁ и отрицательного контроля, сорт А3555. В табл. 11 и 12 также показана стандартная ошибка среднего (СОС) процента повреждения листьев, показанная каждым насекомым для каждого объекта, которая оценивалась относительно отрицательного контроля. "N" представляет количество образцов с каждого растения, используемого в анализе. "СОС" представляет собой стандартную ошибку среднего процента повреждения.

Таблица 11. Средний процент повреждения листьев растений сои R₁, экспрессирующих TIC6757PL

Конструкция	Количество объектов	Количество растений/ объектов	SAW			SBL		
			N	Средний % повреждения	СОС	N	Средний % повреждения	СОС
Конструкция 3	5	6	4	0,37	0,30	4	1,91	0,72
Конструкция 4	8	6	4	0,31	0,25	4	1,25	0,34
Конструкция 5	8	6	4	0,02	0,02	4	0,75	0,35
Конструкция 6	8	6	4	0,76	0,34	4	0,97	0,35
Отрицательный контроль	Сорт А3555	8	4	87,93	9,74	4	79,44	12,44

Таблица 12. Средний процент повреждения листьев растений сои R₁, экспрессирующих TIC6757PL

Конструкция	Количество объектов	Количество растений/ объектов	SPW			VBC		
			N	Средний % повреждения	СОС	N	Средний % повреждения	СОС
Конструкция 3	5	6	4	16,32	3,83	4	1,89	0,60
Конструкция 4	8	6	4	2,25	0,30	4	0,96	0,31
Конструкция 5	8	6	4	2,40	0,50	4	0,51	0,25
Конструкция 6	8	6	4	3,65	0,53	4	0,71	0,32
Отрицательный контроль	Сорт А3555	8	4	97,25	1,09	4	88,88	10,30

Как видно из табл. 11 и 12, растения сои R₁, экспрессирующие белок токсина TIC6757PL, обеспечивают превосходную устойчивость к SAW, SBL, SPW и VBC. Что касается SAW, все четыре объекта продемонстрировали менее одного (1) процента повреждения листьев, в то время как отрицательный контроль имел приблизительно восемьдесят восемь (88) процентов повреждения листьев. Что касается SBL, все четыре (4) объекта продемонстрировали менее двух (2) процентов повреждения листьев, в то время как контроль имел приблизительно 80% повреждения листьев. Что касается SPW, три из четырех объектов продемонстрировали менее четырех (4) процентов повреждения листьев, в то время как контроль имел приблизительно девяносто семь (97) процентов повреждения листьев. Что касается VBC, три объ-

екта продемонстрировали менее одного (1) процента повреждения листьев, и один объект продемонстрировал менее двух (2) процентов повреждения листьев, тогда как отрицательный контроль имел около восьмидесяти девяти (89) процентов повреждения листьев.

Вышеизложенное свидетельствует о том, что трансформированные растения сои, экспрессирующие TIC6757PL, обеспечивают превосходную устойчивость к насекомым отряда чешуекрылых, в частности южной совке (*Spodoptera eridania*), соевой совке (*Chrysodeixis includens*), американской кукурузной совке (*Helicoverpa zea*) и совке бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*).

Пример 5. Анализ активности TIC6757PL по отношению к вредителям отряда чешуекрылых в стабильно трансформированных растениях хлопчатника

Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, сконструированные для экспрессии как нацеленного, так и не нацеленного на пластыды пестицидного белка TIC6757PL, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовались для стабильной трансформации хлопчатников. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биологическом анализе с использованием насекомых против различных насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Синтетическая кодирующая последовательность, сконструированная для экспрессии в растениях, как описано в примере 3 выше, была клонирована в бинарные векторы для трансформации растений и использована для трансформации клеток растения хлопчатника. Бинарные векторы, содержащие нацеленные и не нацеленные на пластыды кодирующие последовательности TIC6757PL, были сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC6757PL, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидерной последовательностью, функционально связанный 5' с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный или не нацеленный на пластыды белок TIC6757PL, который, в свою очередь, функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью и; вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием спектиномицина.

Трансформированные клетки хлопчатника индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биологический анализ с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из нетрансформированного растения хлопчатника, использовали в качестве отрицательного контроля. Множественные объекты трансформации от каждого бинарного вектора оценивались против хлопковой совки (CBW, *Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) и табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*).

Трансформированные растения хлопчатника R₀, экспрессирующие TIC6757PL, были очень эффективными (определялись как имеющие повреждения листьев менее или равное 10%) против CBW, FAW, SBL и TBW, как показано в табл. 13. Высокая пенетрантность (обозначенная буквой "(B)") определялась как пенетрантность более 50% анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 10%. Низкая пенетрантность (обозначенная буквой "(H)") определялась как пенетрантность, менее или равная 50% анализируемых объектов для каждой конструкции, имеющих повреждения листьев менее или равное 10%.

Таблица 13. Количество объектов, экспрессирующих TIC6757PL с повреждением листьев ≤10% и пенетрантностью

Конструкция	Количество объектов с повреждением листьев ≤10%/количество проанализированных объектов (пенетрантность) .			
	CBW	FAW	SBL	TBW
Конструкция 1	22/25 (B)	21/24 (B)	21/25 (B)	21/25 (B)
Конструкция 2	12/15 (B)	6/15 (H)	13/15 (B)	13/15 (B)
Конструкция 3	7/13 (B)	8/14 (B)	4/13 (H)	6/14 (H)
Конструкция 4	11/14 (B)	8/14 (B)	9/14 (B)	10/14 (B)
Конструкция 5	20/25 (B)	19/23 (B)	20/24 (B)	19/23 (B)
Конструкция 6	6/7 (B)	7/7 (B)	7/7 (B)	6/7 (B)
Конструкция 7	22/25 (B)	22/25 (B)	22/25 (B)	22/25 (B)

Пример 6. Анализ активности TIC7472PL и TIC7473PL по отношению к вредителям отряда чешуекрылых в стабильно трансформированных растениях кукурузы

Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, сконструированные для экспрессии как нацеленного, так и не нацеленного на пластыды пестицидного белка TIC7472PL или TIC7473PL, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовали для стабильной трансформации кукурузных растений. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биологическом анализе с использованием насекомых против различных насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Синтетические кодирующие последовательности были сконструированы для применения в экспрессии кодированного белка в растениях, клонированы в бинарный вектор для трансформации растения и использовались для трансформации растительных клеток кукурузы. Синтетические последовательно-

сти синтезировали в соответствии со способами, в целом описанными в патенте США 5500365, избегая некоторых неподходящих проблемных последовательностей, таких как последовательности полиаденилирования растений, обогащенные АТТТА и А/Т, и в то же время сохраняли аминокислотную последовательность нативного белка *Raenibacillus*. Синтетические кодирующие последовательности кодировали белок TIC7472PL и TIC7473PL, который содержит дополнительный остаток аланина непосредственно после иницирующего метионина относительно белка TIC7472 и TIC7473. Для белка, нацеленного на пластиды, синтетическую последовательность, кодирующую пестицидный белок TIC7472PL или TIC7473PL, функционально связывали с сохранением рамки считывания с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, для доставки в хлоропласты. Полученные векторы для трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC7472PL или TIC7473PL, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидерной последовательностью, функционально связанный 5' с интроном, функционально связанный 5' с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный или не нацеленный на пластиды белок TIC7472PL или TIC7473PL, который, в свою очередь, функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью; и вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием глифосата. Синтетическая кодирующая последовательность для пестицидного белка TIC7472PL представлена в виде SEQ ID NO: 15 и кодирует белок, представленный в виде SEQ ID NO: 16. Синтетическая кодирующая последовательность для пестицидного белка TIC7473PL представлена в виде SEQ ID NO: 17 и кодирует белок, представленный в виде SEQ ID NO: 18.

Растения кукурузы трансформировали бинарными векторами для трансформации, как описано выше, с применением способа трансформации, опосредованной *Agrobacterium*.

Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биологический анализ с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из нетрансформированного растения кукурузы, использовали в качестве отрицательного контроля.

Множество объектов трансформации для каждого бинарного вектора оценивали против совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*), а также других насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Насекомые-вредители наблюдались на наличие задержки роста и смертности, вызванных поеданием листовых дисков, экспрессирующих TIC7472PL или TIC7473PL, и сравнивались с листовыми дисками, полученными из нетрансформированных растений кукурузы.

Пример 7. Анализ активности TIC6757PL по отношению к вредителям отряда чешуекрылых в стабильно трансформированных растениях сои и хлопчатника

Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, сконструированные для экспрессии как нацеленного, так и не нацеленного на пластиды пестицидного белка TIC7472PL или TIC7473PL, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовались для стабильной трансформации растений сои и хлопчатника. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биологическом анализе с использованием насекомых против различных насекомых-вредителей отряда чешуекрылых.

Синтетическую кодирующую последовательность, сконструированную для экспрессии в растениях, как описано в примере 6 выше, клонировали в бинарные векторы для трансформации растений, и использовали для трансформации клеток растения сои или хлопчатника. Бинарные векторы, содержащие нацеленные и не нацеленные на пластиды кодирующие последовательности TIC7472PL или TIC7473PL, сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC7472PL или TIC7473PL, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидерной последовательностью, функционально связанный 5' с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный или не нацеленный на пластиды белок TIC7472PL или TIC7473PL, который, в свою очередь, функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью и; вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием спектиномина. Конструкции 1, 2 и 7 содержат последовательность клонирования, которая кодирует не нацеленный пестицидный белок TIC6757PL. Конструкции 3, 4, 5 и 6 содержат кодирующую последовательность, которая кодирует нацеленный пестицидный белок TIC6757PL.

Трансформированные клетки сои или хлопчатника индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биологический анализ с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из нетрансформированных растений сои или хлопчатника, использовали в качестве отрицательного контроля. Множественные объекты трансформации от каждого бинарного вектора оценивались против южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), американской кукурузной совки (SPW, *Helicoverpa zea*) кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), табачной листовёртки (*Heliothis virescens*), совки

хлопковой (CBW, *Helicoverpa zea*) и совки бархатных бобов (VBW, *Anticarsia gemmatalis*), а также других насекомых-вредителей отряда чешуекрылых. Насекомые-вредители наблюдались на наличие задержки роста и смертности, вызванных поеданием листовых дисков, экспрессирующих TIC7472PL или TIC7473PL, и сравнивались с листовыми дисками, полученными из нетрансформированных растений сои или хлопчатника.

Все композиции, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть сделаны и выполнены без излишнего экспериментирования в свете настоящего описания. Хотя композиции настоящего изобретения были описаны с точки зрения вышеизложенных иллюстративных вариантов реализации изобретения, специалистам в данной области техники будет понятно, что варианты, изменения, модификации и перестройки могут быть применены к композиции, описанной в данном документе, без отступления от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые вещества, являющиеся как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены на вещества, которые описаны в данном изобретении, при этом будут достигнуты такие же или сходные результаты. Все таковые 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.

Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в настоящей спецификации, включены в данный документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидным сегментом, кодирующим пестицидный белок, при этом:

а) указанный пестицидный белок содержит SEQ ID NO: 4 или

б) указанный полинуклеотидный сегмент гибридизуется в жестких условиях гибридизации с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с вектором и указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, фагамиды, бакмиды, космиды и бактериальной или дрожжевой искусственной хромосомы.

3. Клетка-хозяин, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки и растительной клетки.

4. Клетка-хозяин по п.3, отличающаяся тем, что указанная бактериальная клетка происходит из рода бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* и *Erwinia*.

5. Клетка-хозяин по п.4, отличающаяся тем, что указанный вид *Bacillus* представляет собой *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанный *Brevibacillus* представляет собой *Brevibacillus laterosporous* и указанный *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*.

6. Клетка-хозяин по п.3, отличающаяся тем, что указанная растительная клетка представляет собой клетку двудольного или однодольного растения-хозяина.

7. Клетка-хозяин по п.6, отличающаяся тем, что указанная растительная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из растительной клетки люцерны, банана, ячменя, бобов, брокколи, капусты, моркови, маниоки, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, кокосовой пальмы, кофе, кукурузы, клевера, хлопчатника, огурца, Дугласовой пихты, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата-латука, сосны ладанной, дыни, ореха, овса, оливы, лука, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, ржи, американского шафрана, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза и пшеницы.

8. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанный белок проявляет активность против насекомого отряда чешуекрылых.

9. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.8, отличающаяся тем, что указанное насекомое отряда чешуекрылых выбрано из группы, состоящей из совки бархатных бобов, огневки тростниковой, точильщика зернового кукурузного, совки хлопковой, табачной листовертки, соевой совки, африканской совки, южной совки, кукурузной листовой совки, совки свекольной, совки американской, азиатской хлопковой совки, розового коробочного червя хлопчатника, совки-ипсилон, огневки кукурузной юго-западной, совки хлопковой американской, капустной моли, совки пятнистой, табачной совки, совки бобовой западной и мотылька стеблевого кукурузного.

10. Растение или его часть, содержащее молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, где

указанное растение или его часть устойчиво к заражению насекомыми.

11. Растение или его часть по п.10, отличающееся тем, что указанное растение является однодольным растением или двудольным растением.

12. Растение по п.10, отличающееся тем, что растение выбирают из группы, состоящей из люцерны, банана, ячменя, бобов, брокколи, капусты, моркови, маниоки, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, кокосовой пальмы, кофе, кукурузы, клевера, хлопчатника, огурца, Дугласовой пихты, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата-латука, сосны ладанной, дыни, ореха, овса, оливы, лука, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубиногороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, ржи, американского шафрана, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза и пшеницы.

13. Растение или его часть по п.10, где указанная часть представляет собой семя, содержащее указанную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

14. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1 или пестицидный белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по п.1.

15. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.14, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один пестицидный агент, где указанный один пестицидный агент не является пестицидным белком, кодируемым молекулой нуклеиновой кислоты по п.1.

16. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.15, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один другой пестицидный агент выбирают из группы, состоящей из белка, обладающего ингибиторной активностью в отношении насекомых, молекулы дцРНК, обладающей ингибиторной активностью в отношении насекомых, и вспомогательного белка.

17. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.15, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один другой пестицидный агент проявляет активность в отношении одного или более видов вредителей отрядов чешуекрылых, жесткокрылых или полужесткокрылых.

18. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.15, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один другой пестицидный агент является выбранным из группы, состоящей из Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1, IP3, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 и белка DIG-11.

19. Растение или его часть по п.10, где указанная часть представляет собой растительную клетку.

20. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.14, где композиция находится в составе товарного продукта.

