

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092718** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/12* (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.15

(54) **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПАТОГЕНОВ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/672,022

(32) 2018.05.15

(33) US

(86) PCT/US2019/032473

(87) WO 2019/222390 2019.11.21

(71) Заявитель:

**ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ
ИННОВЕЙШНЗ VI, ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:

**Ван Роен Мария Хелена Кристин,
Мартин Барри Эндрю, Там Хок
Хей, Мартинес Игнасио, Нуколова
Наталия Владимировна, Швайцер
Саймон, Кабанильяс Дэниел Гарсия
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе раскрыты композиции для контроля патогенов, включающие совокупность пакетов-мессенджеров растений (например, включающие растительную внеклеточную везикулу (EV) или ее сегмент, часть или экстракт), которые пригодны в способах лечения или предупреждения инфекции у животного и/или снижения приспособленности патогенов (например, патогенов животных) или их переносчиков.

A1

202092718

202092718

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565834EA/061

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПАТОГЕНОВ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Патогены, включая патогены животных (например, бактерии, грибы, паразиты или вирусы), вызывают тяжелые заболевания у людей и животных. Хотя для контроля патогенов животных или их переносчиков применялись многие способы, потребность в безопасных и эффективных стратегиях контроля патогенов возрастает. Таким образом, в данной области существует потребность в новых способах и композициях для контроля патогенов животных.

Краткое описание изобретения

В данном документе раскрыты композиции для контроля патогенов, включая совокупность пакетов-мессенджеров растений, которые применимы в способах лечения инфекций у животного, нуждающегося в этом, предупреждения инфекции у животного, подверженного такому риску, или снижения приспособленности патогенов (например, патогенов животных) или их переносчиков.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность пакетов-мессенджеров растений (РМР), где композиция составлена для введения животному, и где композиция включает в себя по меньшей мере 5% РМР, как измерено по соотношению вес/об., процентному содержанию белков РМР в композиции и/или процентному содержанию липидов в композиции (например, посредством измерения флуоресцентно меченых липидов).

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где композиция составлена для доставки по отношению к патогену животного, и где композиция включает в себя по меньшей мере 5% РМР.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где композиция составлена для доставки по отношению к переносчику патогена животного, и где композиция включает в себя по меньшей мере 5% РМР.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или является стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для снижения приспособленности патогена животного или переносчика патогена животного. В некоторых вариантах осуществления совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для лечения инфекции у животного, инфицированного патогеном. В других вариантах осуществления совокупность РМР в композиции

представлена в концентрации, эффективной для предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования патогеном.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для снижения приспособленности патогена животного.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для снижения приспособленности переносчика патогена животного.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для лечения инфекции у животного, инфицированного патогеном.

И в еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования патогеном.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,01 нг, 0,1 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг, 250 нг, 500 нг, 750 нг, 1 мкг, 10 мкг, 50 мкг, 100 мкг или 250 мкг белка РМР/мл. В некоторых вариантах осуществления совокупность РМР дополнительно включает в себя дополнительное средство для контроля патогенов.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где каждый РМР из совокупности РМР включает в себя гетерологичное средство для контроля патогенов, и где композиция составлена для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его переносчику.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой противобактериальное средство, например, доксорубин, противогрибковое средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство против насекомых. В некоторых вариантах осуществления противобактериальное средство представляет собой антибиотик, например, ванкомицин, пенициллин, цефалоспорин, монобактам, карбапенем, макролид, аминогликозид, хинолон, сульфонамид, тетрациклин, гликопептид, липогликопептид, оксазолидинон, рифамицин, туберактиномицин, хлорамфеникол, метронидазол, тинидазол, нитрофурантоин, тейкопланин, телаванцин, линезолид, циклосерин 2, бацитрацин, полимиксин В, виомицин или капреомицин.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов противогрибковое средство представляет собой аллиламин, имидазол, триазол, тиазол, полиен или эхинокандин.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов инсектицидное средство представляет собой хлорникотинил, неоникотиноид, карбамат, фосфорорганическое соединение, пиретроид, оксадиазин, спинозин, циклодиен, хлорорганическое соединение, фипрол, мектин, диацилгидразин, бензоилмочевину, оловоорганическое соединение, пиррол, динитротерпенол, METI, тетрановую кислоту, тетрамовую кислоту или фталамид.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой низкомолекулярное соединение (например, антибиотик или вторичный метаболит), нуклеиновую кислоту (например, ингибирующую РНК) или полипептид.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов гетерологичное средство для контроля патогенов инкапсулировано каждым РМР из совокупности РМР; встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР или конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР. В некоторых вариантах осуществления каждый РМР из совокупности РМР дополнительно включает дополнительное средство для контроля патогенов.

В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию (например, вид *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas aeruginosa*), вид *Escherichia* (например, *Escherichia coli*), вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*), гриб (например, вид *Saccharomyces* или вид *Candida*), паразитическое насекомое (например, вид *Cimex*), паразитическую нематоду (например, вид *Heligmosomoides*) или паразитическое простейшее (например, вид *Trichomonas*).

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов переносчиком является комар, клещ, микроскопический клещ или вошь.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C; стабильной в течение по меньшей мере 24 часов, 48 часов, семи дней или 30 дней при 4°C или стабильной при температуре по меньшей мере 20°C, 24°C или 37°C.

В некоторых вариантах осуществления композиции для контроля патогенов совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для снижения приспособленности патогена животного или переносчика патогена животного; эффективной для лечения инфекции у животного, инфицированного патогеном; или эффективной для предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования патогеном.

В некоторых вариантах осуществления совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,01 нг, 0,1 нг, 1 нг, 2 нг, 3

нг, 4 нг, 5 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг, 250 нг, 500 нг, 750 нг, 1 мкг, 10 мкг, 50 мкг, 100 мкг или 250 мкг белка РМР/мл.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель или фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для стабилизации РМР. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция включает в себя по меньшей мере 5% РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция для контроля патогенов, включающая в себя совокупность РМР, где РМР выделены из растения с помощью способа, который включает стадии (а) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть включают в себя EV; (b) выделения фракции неочищенных РМР из исходного образца, где фракция неочищенных РМР имеет пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце; (с) осуществления очистки фракции неочищенных РМР с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР имеет пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; (d) загрузки совокупности РМР из стадии (с) средством для контроля патогенов и (е) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его вектору.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен патоген животного, включающий любую из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен переносчик патогена животного, включающий любую из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ доставки композиции для контроля патогенов по отношению к животному, включающий введение животному любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения инфекции у животного, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение животному эффективного количества любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования, при этом способ включает введение животному эффективного количества любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, где способ снижает вероятность

инфицирования животного по сравнению с необработанным животным.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов инфекция вызвана патогеном, и при этом патоген представляет собой бактерию (например, вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, *Salmonella* или вид *Campylobacter*), гриб (например, вид *Saccharomyces* или вид *Candida*), вирус, паразитическое насекомое (например, вид *Cimex*), паразитическую нематоду (например, вид *Heligmosomoides*) или паразитическое простейшее (например, вид *Trichomonas*).

В некоторых вариантах осуществления композицию для контроля патогенов вводят животному перорально, внутривенно или подкожно.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ доставки композиции для контроля патогенов по отношению к патогену, включающий приведение патогена в контакт с любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности патогена, при этом способ включает доставку по отношению к патогену любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, где способ снижает приспособленность патогена по сравнению с необработанным патогеном.

В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где патоген растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение. В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют в виде пригодной для питания патогена композиции для поглощения патогеном.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов патоген представляет собой бактерию (например, вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*), гриб (например, вид *Saccharomyces* или вид *Candida*), паразитическое насекомое (например, вид *Cimex*), паразитическую нематоду (например, вид *Heligmosomoides*) или паразитическое простейшее (например, вид *Trichomonas*).

В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности переносчика патогена животного, при этом способ включает доставку по отношению к переносчику эффективного количества любой из композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.

В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где переносчик растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение. В некоторых вариантах

осуществления композицию доставляют в виде пригодной для питания композиции для поглощения переносчиком. В некоторых вариантах осуществления переносчиком является насекомое, например, комар, клещ, микроскопический клещ или вошь. В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя противогрибковое средство.

В некоторых вариантах осуществления противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена гриба, вызывающего грибковую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления ген представляет собой ген белка усиленного роста нитевидной формы (EFG1). В некоторых вариантах осуществления грибковая инфекция вызвана *Candida albicans*.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает в себя РМР, полученный из *Arabidopsis*.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает или в значительной степени устраняет грибковую инфекцию.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя противобактериальное средство.

В некоторых вариантах осуществления противобактериальное средство представляет собой амфотерицин В.

В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает в себя РМР, полученный из *Arabidopsis*.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает или в значительной степени устраняет бактериальную инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой животное, подлежащее ветеринарному лечению, или животное, относящееся к домашнему скоту.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя инсектицидное средство.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидное средство представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления паразитическое насекомое представляет собой постельного клопа.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает приспособленность паразитического насекомого по сравнению с необработанным паразитическим насекомым.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя нематоцидное средство.

В некоторых вариантах осуществления паразитическая нематода представляет собой *Heligmosomoides polygyrus*.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает приспособленность паразитической нематоды по сравнению с необработанной паразитической нематодой.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя противопаразитарное средство.

В некоторых вариантах осуществления паразитическое простейшее представляет собой *T. vaginalis*.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает приспособленность паразитического простейшего по сравнению с необработанным паразитическим простейшим.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя инсектицидное средство.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком. В некоторых вариантах осуществления насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

Другие характеристики и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Определения

Используемый в данном документе термин "животное" относится к людям, домашнему скоту, животным, выращиваемым на ферме, или животным, являющимся млекопитающими, подлежащими ветеринарному лечению (например, включая, например, собак, кошек, лошадей, кроликов, животных зоопарка, коров, свиней, овец, кур и приматов, не относящихся к человеку).

Используемый в данном документе термин "снижение приспособленности патогена" относится к любому нарушению физиологии патогена как следствию введения композиции для контроля патогенов, описанной в данном документе, включая без ограничения любой один или несколько из следующих требуемых эффектов: (1) уменьшение популяции патогена на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (2) уменьшение показателя репродукции патогена на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (3) уменьшение подвижности патогена на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (4) уменьшение веса тела или массы патогена на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (5) уменьшение скорости метаболизма или активности патогена на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше или (6) уменьшение передачи патогена (например, вертикальной или горизонтальной передачи патогена от одного насекомого к другому) патогеном на

приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше. Уменьшение приспособленности патогена может быть определено, например, по сравнению с необработанным патогеном.

Используемый в данном документе термин "снижение приспособленности переносчика" относится к любому нарушению физиологии переносчика или любой активности, осуществляемой указанным переносчиком, как следствию введения композиции для контроля переносчиков, описанной в данном документе, включая без ограничения любой один или несколько из следующих требуемых эффектов: (1) уменьшение популяции переносчика на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (2) уменьшение показателя репродукции переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (3) уменьшение подвижности переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (4) уменьшение веса тела переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (5) увеличение скорости метаболизма или активности переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (6) уменьшение передачи патогена переносчик-переносчик (например, вертикальной или горизонтальной передачи переносчика от одного насекомого к другому) переносчиком (например, насекомым, например, комаром, клещом, микроскопическим клещом или вошью) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (7) уменьшение передачи патогена от переносчика-животного на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (8) уменьшение продолжительности жизни переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; (9) увеличение восприимчивости переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) к пестицидам (например, инсектицидам) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше; или (10) уменьшение векторной компетентности переносчика (например, насекомого, например, комара, клеща, микроскопического клеща или вши) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше. Уменьшение приспособленности переносчика может быть определено, например, по сравнению с необработанным переносчиком.

Используемый в данном документе термин "составленный для доставки по отношению к животному" относится к композиции для контроля патогенов, которая

включает фармацевтически приемлемый носитель.

Используемый в данном документе термин "составленный для доставки по отношению к патогену" относится к композиции для контроля патогенов, которая включает фармацевтически приемлемый или приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

Используемый в данном документе термин "составленный для доставки по отношению к переносчику" относится к композиции для контроля патогенов, которая включает приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

Используемый в данном документе термин "инфекция" относится к присутствию или колонизации патогена в животном (например, в одной или нескольких частях организма животного), на животном (например, на одной или нескольких частях организма животного) или в среде обитания, окружающей животное, в частности там, где инфекция снижает приспособленность животного, например, вызывая заболевание, симптомы заболевания или иммунный (например, воспалительный) ответ.

Определенные в данном документе термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к РНК или ДНК, которые являются линейными или разветвленными, одно- или двухцепочечными, или их гибридами, независимо от длины (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 или больше нуклеиновых кислот). Термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Как правило, нуклеотиды в нуклеиновой кислоте связаны посредством сложных фосфодиэфирных связей, хотя термин "нуклеиновая кислота" также охватывает аналоги нуклеиновых кислот, имеющие другие типы связей или остовов (например, среди прочих, фосфорамидные, фосфотиоатные, фосфодитиоатные, O-метилфосфорамидатные, морфолиновые, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), глицериновые нуклеиновые кислоты (GNA), нуклеиновые кислоты с треозой (TNA) и связи или остовы пептидных нуклеиновых кислот (PNA)). Нуклеиновые кислоты могут быть одонитевыми, двухнитевыми или содержать части как одонитевой, так и двухнитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может содержать любую комбинацию дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов, а также любую комбинацию оснований, в том числе, например, аденин, тимин, цитозин, урацил и модифицированные или неканонические основания (в том числе, например, гипоксантин, ксантин, 7-метилгуанин, 5,6-дигидроурацил, 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин).

Используемый в данном документе термин "патоген" относится к организму, такому как микроорганизм или беспозвоночное, который вызывает заболевание или симптомы заболевания у животного, например, (i) непосредственно инфицируя животное, (ii) продуцируя вещества, вызывающие заболевание или симптомы заболевания у животного (например, бактерии, которые продуцируют патогенные токсины и т. п.), и/или (iii) который вызывает иммунный (например, воспалительный ответ) у животных (например, кусающие насекомые, например постельные клопы). В контексте данного документа патогены включают без ограничения бактерии, простейшие, паразиты, грибы,

нематоды, насекомые, вириды и вирусы или любую их комбинацию, где каждый патоген сам по себе или совместно с другим патогеном способен вызывать заболевание или симптомы у людей.

Используемый в данном документе термин "композиция для контроля патогенов" относится к противобактериальной, противогрибковой, вируцидной, противовирусной, противопаразитарной (например, противогельминтные средства), паразитицидной, противопаразитарной, инсектицидной, нематоцидной или репеллентной композиции против переносчиков, которая содержит совокупность пакетов-мессенджеров растений (РМР). Каждый РМР из совокупности РМР может содержать средство для контроля патогенов, например, гетерологичное средство для контроля патогенов.

Используемые в данном документе термины "пептид", "белок" или "полипептид" охватывают любую цепь из встречающихся в природе или не встречающихся в природе аминокислот (либо D-, либо L-аминокислот), независимо от длины (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100 или больше аминокислот), наличия или отсутствия посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования или фосфорилирования) или наличия, например, одной или нескольких отличных от аминокислотных групп (например, углеводных, липидных и т. д.), ковалентно связанных с пептидом, и включают, например, природные белки, синтетические или рекомбинантные полипептиды и пептиды, гибридные молекулы, пептоиды или пептидомиметики.

Как используется в данном документе, "процент идентичности" между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма BLAST 2.0, который описан в Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно благодаря Национальному центру биотехнологической информации.

Используемый в данном документе термин "средство для контроля патогенов" относится к средству, композиции или веществу в их составе, которые контролируют или снижают приспособленность (например, уничтожают или ингибируют рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение) сельскохозяйственных, экологических или домашних/бытовых патогенов или переносчиков патогенов, таких как насекомое, моллюск, нематода, грибок, бактерия или вирус. Под средствами для контроля патогенов понимают встречающиеся в природе или синтетические инсектициды (ларвициды или адультициды), регуляторы роста насекомых, акарициды (митициды), моллюскоциды, нематоциды, эктопаразитоциды, бактерициды, фунгициды или гербициды. Термин "средство для контроля патогенов" может дополнительно охватывать другие биологически активные молекулы, такие как антибиотики, противовирусные средства, пестициды, противогрибковые средства, противогельминтные средства, питательные вещества и/или средства, которые останавливают или замедляют движение патогена или переносчика патогена. В некоторых случаях средство для контроля патогенов представляет собой аллелохимическое вещество. Используемый в данном

документе термин "аллелохимикат" или "аллелохимическое средство" представляет собой вещество, продуцируемое организмом (например, растением), которое способно воздействовать на физиологическую функцию (например, зарождение, рост, выживаемость или размножение) другого организма (например, патогена или переносчика патогена).

Средство для контроля патогенов может являться гетерологичным. Используемый в данном документе термин "гетерологичный" относится к средству (например, средству для контроля патогенов), которое является либо (1) экзогенным в отношении растения (например, получено из источника, который не является растением или частью растения, из которых получен РМР) (например, добавлено к РМР с использованием подходов в отношении загрузки, описанных в данном документе), либо (2) эндогенным по отношению к растительной клетке или ткани, из которых получен РМР, однако присутствует в РМР (например, добавлено к РМР с использованием подходов в отношении загрузки, описанных в данном документе, генетической инженерии, подходов *in vitro* or *in vivo*) в концентрации, которая выше, чем обнаруженная в природе (например, выше, чем концентрация, обнаруженная во встречающейся в природе внеклеточной растительной везикуле).

Используемый в данном документе термин "растение" относится к целым растениям, органам растений, растительным тканям, растительным клеткам, семенам и их потомству. Растительные клетки включают без ограничения клетки из семян, суспензионных культур, зародышей, участков меристем, каллюсной ткани, листьев, корней, побегов, гаметофитов, спорофитов, пыльцы и микроспор. Части растений включают дифференцированные и недифференцированные ткани, включая без ограничения: корни, стебли, побеги, листья, пыльцу, семена, плод, собранный продукт, опухолевую ткань, а также различные формы клеток и культуру (например, отдельные клетки, протопласты, зародыши и каллюсную ткань). Растительная ткань может находиться в растении или в органе, ткани или культуре клеток растения. Кроме того, растение может быть генетически сконструированным с получением гетерологичного белка или РНК, например, любой из композиций для контроля патогенов в способах и композициях, описанных в данном документе.

Используемые в данном документе термины "растительная внеклеточная везикула", "растительная EV" или "EV" относятся к замкнутой структуре из бислоя липидов, встречающейся в природе в растении. Необязательно, растительная EV содержит один или несколько маркеров растительной EV. Используемый в данном документе термин "маркер растительной EV" относится к компоненту, который в природе ассоциирован с растением, такому как растительный белок, растительная нуклеиновая кислота, растительное низкомолекулярное соединение, растительный липид или их комбинации, включая без ограничения любой из маркеров растительной EV, перечисленных в приложении. В некоторых случаях маркер растительной EV представляет собой идентифицирующий маркер растительной EV, но не пестицидное

средство. В некоторых случаях маркер растительной EV представляет собой идентифицирующий маркер растительной EV, а также пестицидное средство (например, либо ассоциирован с совокупностью РМР, или инкапсулирован ей, либо не непосредственно ассоциирован с совокупностью РМР или инкапсулирован ею).

Используемые в данном документе термины "пакет-мессенджер растений" или "РМР" относятся к липидной структуре (например, из бислоя липидов, униламеллярной, мультиламеллярной структуре; например, везикулярной липидной структуре), диаметр которой составляет приблизительно 5-2000 нм (например, по меньшей мере 5-1000 нм, по меньшей мере 5-500 нм, по меньшей мере 400-500 нм, по меньшей мере 25-250 нм, по меньшей мере 50-150 нм или по меньшей мере 70-120 нм), которая получена из (например, обогащена, выделена или очищена из) растительного источника или его сегмента, части или экстракта, включая липидные компоненты или компоненты, отличные от липидов (например, пептиды, нуклеиновые кислоты или низкомолекулярные соединения), ассоциированные с ними, и которая была обогащена, выделена или очищена из растения, части растения или растительной клетки, при этом при обогащении или выделении удаляется один или нескольких контаминантов или нежелательных компонентов из исходного растения. РМР могут представлять собой высокоочищенные препараты встречающихся в природе EV. Предпочтительно, по меньшей мере 1% контаминантов или нежелательных компонентов из исходного растения удаляется (например, по меньшей мере 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%) из одного или нескольких контаминантов или нежелательных компонентов из исходного растения, например, компонентов клеточной стенки растения; пектина; растительных органелл (например, митохондрий; пластид, таких как хлоропласты, лейкопласты или амилопласты; и ядер); растительного хроматина (например, растительной хромосомы) или растительных молекулярных агрегатов (например, белковых агрегатов, агрегатов белок-нуклеиновая кислота, липопротеиновых агрегатов или липидопротеиновых структур). Предпочтительно, РМР является на по меньшей мере 30% чистым (например, на по меньшей мере 40% чистым, по меньшей мере 50% чистым, по меньшей мере 60% чистым, по меньшей мере 70% чистым, по меньшей мере 80% чистым, по меньшей мере 90% чистым, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% чистым) по сравнению с одним или несколькими контаминантами или нежелательными компонентами из исходного растения, как измерено по весу (вес/вес), спектральной визуализации (% пропускания) или проводимости (См/м).

РМР могут необязательно содержать дополнительные средства, такие как гетерологичные функциональные средства, например, средства для контроля патогенов, репеллентные средства, полинуклеотиды, полипептиды или низкомолекулярные соединения. РМР могут нести дополнительные средства или могут быть ассоциированы с ними (например, гетерологичными функциональными средствами) различными путями для обеспечения доставки средства целевому растению, например, посредством

инкапсулирования средства, включения средства в структуру из бислоя липидов или ассоциации средства (например, посредством конъюгации) с поверхностью структуры из бислоя липидов. Гетерологичные функциональные средства могут быть включены в РМР либо *in vivo* (например, *in planta*), либо *in vitro* (например, в культуре ткани, в культуре клеток или включены синтетическим путем). Используемый в данном документе термин "репеллентное средство" относится к средству, композиции или находящемуся в ней веществу, которые удерживают переносчиков патогенов (например, насекомых, например, комаров, клещей, микроскопических клещей или вшей) от приближения к животному или пребывания на животном. Репеллентное средство может, например, уменьшать количество переносчиков патогенов на животном или в непосредственной близости от него, но не обязательно уничтожать или уменьшать приспособленность переносчика патогенов.

Используемый в данном документе термин "лечение" относится к введению фармацевтической композиции животному в профилактических и/или терапевтических целях. Термин "предупредить инфекцию" относится к профилактическому лечению животного, которое еще не болеет, но которое восприимчиво или иным образом подвержено риску определенного заболевания. Термин "лечить инфекцию" относится к применению лечения по отношению к животному, уже страдающему заболеванием, для улучшения или стабилизации состояния животного.

Используемый в данном документе термин "лечить инфекцию" относится к применению лечения по отношению к индивидууму, уже страдающему заболеванием, для улучшения или стабилизации состояния индивидуума. Это может включать уменьшение колонизации патогена внутри организма животного, на нем или вокруг него одним или несколькими патогенами (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%) по сравнению с исходным количеством и/или обеспечение пользы для индивидуума (например, уменьшение колонизации в количестве, достаточном для устранения симптомов). В таких случаях подвергнутая лечению инфекция может проявляться в виде уменьшения симптомов (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%). В некоторых случаях подвергнутая лечению инфекция эффективна для увеличения вероятности выживания индивидуума (например, увеличения вероятности выживания на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%) или увеличения общей выживаемости популяции (например, увеличения вероятности выживания на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%). Например, композиции и способы могут быть эффективными для "существенного устранения" инфекции, что относится к уменьшению инфекции в размере, достаточном для устойчивого устранения симптомов (например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 месяцев) у животного.

Используемый в данном документе термин "предупредить инфекцию" относится к предупреждению увеличения колонизации внутри организма животного, на нем или

вокруг него одним или несколькими патогенами (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше чем 100% по сравнению с необработанным животным) в количестве, достаточном для поддержания исходной популяции патогенов (например, примерно в количестве, обнаруживаемом у здорового индивидуума), предупреждения начала инфекции и/или предупреждения симптомов или состояний, ассоциированных с инфекцией. Например, индивидуумы могут получать профилактическое лечение для предупреждения грибковой инфекции при подготовке к инвазивной медицинской процедуре (например, при подготовке к операции, такой как получение трансплантата, терапия стволовыми клетками, трансплантация, протезирование, длительное или частое получение внутривенной катетеризации или получение лечения в отделении интенсивной терапии), у индивидуумов с ослабленным иммунитетом (например, у индивидуумов, страдающих от рака, ВИЧ/СПИДом или принимающих иммунодепрессанты) или у индивидуумов, проходящих длительную терапию антибиотиками.

Используемый в данном документе термин "стабильная композиция на основе РМР" (например, композиция, содержащая загруженные или незагруженные РМР) относится к композиции на основе РМР, которая в течение периода времени (например, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 60 дней или по меньшей мере 90 дней) сохраняет по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100%) от исходного количества РМР (например, РМР на мл раствора) по сравнению с количеством РМР в композиции на основе РМР (например, во время получения или составления), необязательно в определенном диапазоне температуры (например, при температуре, составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C или 30°C), по меньшей мере 20°C (например, по меньшей мере 20°C, 21°C, 22°C или 23°C), по меньшей мере 4°C (например, по меньшей мере 5°C, 10°C или 15°C), по меньшей мере -20°C (например, по меньшей мере -20°C, -15°C, -10°C, -5°C или 0°C) или -80°C (например, по меньшей мере -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C или -30°C)); или сохраняет по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100%) своей активности (например, активности в отношении контроля патогенов или репеллентной активности) по сравнению с исходной активностью РМР (например, во время получения или составления), необязательно в определенном диапазоне температуры (например, при температуре, составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C или 30°C), по меньшей мере 20°C (например, по меньшей мере 20°C, 21°C, 22°C или 23°C), по меньшей мере 4°C (например, по меньшей мере 5°C, 10°C или 15°C), по меньшей мере -20°C (например, по меньшей мере -20°C, -15°C, -10°C, -5°C или 0°C) или -80°C (например, по меньшей мере -

80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C или -30°C)).

Используемый в данном документе термин "необработанный" относится к животному или переносчику патогенов, которые не были приведены в контакт с композицией для контроля патогенов, или которым она не была доставлена, включая отдельное животное, которому не была доставлена композиция для контроля патогенов, то же животное, подвергавшееся лечению, оцениваемое в момент времени до доставки композиций для контроля патогенов, или то же животное, подвергавшееся лечению, оцениваемое по необработанной части организма животного.

Используемый в данном документе термин "переносчик" относится к насекомому, которое может передавать или переносить патогена животного из резервуара к животному. Иллюстративные переносчики включают насекомых, таких как насекомые с колюще-сосущими ротовыми аппаратами, которые встречаются у Hemiptera и некоторых Hymenoptera и Diptera, таких как комары, пчелы, осы, галлицы, вши, муха цеце, блохи и муравьи, а также представителей Arachnidae, такие как иксодовые клещи и микроскопические клещи.

Используемые в данном документе термины "соковый мешочек" или "соковая везикула" относятся к содержащему сок связанному с мембраной компоненту эндокарпия (плодолистика) гесперидия, например, плода цитрусовых. В некоторых аспектах соковые мешочки отделены от других частей плода, например, кожуры (экзокарпия или флаведо), внутренней кожуры (мезокарпия, альбедо или сердцевины), центрального столбика (плаценты), стенок сегментов или семян. В некоторых аспектах соковые мешочки представляют собой соковые мешочки грейпфрута, лимона, лайма или апельсина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан протокол получения РМР грейпфрута с использованием стадии деструктивного выжимания сока, включающей использование измельчителя, с последующими ультрацентрифугированием и очисткой в градиенте сахарозы. Включены изображения грейпфрутового сока после центрифугирования при 1000 x g в течение 10 мин и паттерн полос градиента сахарозы после ультрацентрифугирования при 150000 x g в течение 2 часов.

Фиг. 1В представляет собой график распределения РМР-частиц, измеренного с помощью Spectradyne NCS1.

Фиг. 2 представляет собой схематическую диаграмму, демонстрирующую протокол получения РМР грейпфрута с использованием стадии мягкого выжимания сока, включающей использование сетчатого фильтра, с последующим ультрацентрифугированием и очисткой в градиенте сахарозы. Включены изображения грейпфрутового сока после центрифугирования при 1000 x g в течение 10 мин и паттерн полос градиента сахарозы после ультрацентрифугирования при 150000 x g в течение 2 часов.

Фиг. 3А представляет собой схематическую диаграмму, демонстрирующую

протокол получения РМР грейпфрута с использованием ультрацентрифугирования с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) с выделением фракций, содержащих РМР. Элюированные фракции SEC анализировали в отношении концентрации частиц (NanoFCM), медианного размера частиц (NanoFCM) и концентрации белка (BCA).

Фиг. 3В представляет собой график, демонстрирующий концентрацию частиц на мл в элюированных фракциях эксклюзионной хроматографии (SEC) (NanoFCM). Фракции, содержащие большую часть РМР ("фракция РМР"), отмечены стрелкой. РМР элюируются во фракциях 2-4.

Фиг. 3С представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующих размер частиц в нм для отобранных фракций SEC, измеренный с использованием NanoFCM. На графиках показано распределение РМР по размеру во фракциях 1, 3, 5 и 8.

Фиг. 3D представляет собой график, демонстрирующий концентрацию белка в мкг/мл во фракциях SEC, измеренную с помощью BCA-анализа. Фракция, содержащая большую часть РМР ("фракция РМР"), помечена, а стрелка указывает на фракцию, содержащую контаминанты.

Фиг. 4А представляет собой схематическую диаграмму, демонстрирующую протокол для масштабированного получения РМР из 1 литра грейпфрутового сока (~7 грейпфрутов) с использованием соковыжималки с последующим дифференциальным центрифугированием для удаления крупного дебриса, 100х концентрации сока с использованием TFF и эксклюзионной хроматографии (SEC) с выделением фракций, содержащих РМР. Элюированные фракции SEC анализировали в отношении концентрации частиц (NanoFCM), медианного размера частиц (NanoFCM) и концентрации белка (BCA).

Фиг. 4В представляет собой пару графиков, демонстрирующих концентрацию белка (BCA-анализ, верхняя панель) и концентрацию частиц (NanoFCM, нижняя панель) в объеме элюата SEC (мл) из масштабированного исходного материала, составляющем 1000 мл грейпфрутового сока, демонстрирующего большое количество контаминантов в поздних объемах элюирования SEC.

Фиг. 4С представляет собой график, демонстрирующий, что инкубация фракции неочищенных РМР грейпфрута с конечной концентрацией EDTA, составляющей 50 мМ, pH 7,15, с последующим диализом в течение ночи с использованием мембраны 300 кДа приводила к успешному удалению контаминантов, присутствующих во фракциях позднего элюирования SEC, как показано по поглощению при 280 нм. Не было разницы в используемых буферах для диализа (PBS без кальция/магния, pH 7,4, MES pH 6, Tris pH 8,6).

Фиг. 4D представляет собой график, демонстрирующий, что инкубация фракции неочищенных РМР грейпфрута с конечной концентрацией EDTA, составляющей 50 мМ, pH 7,15, с последующим диализом в течение ночи с использованием мембраны 300 кДа приводила к успешному удалению контаминантов, присутствующих во фракциях позднего элюирования после SEC, как показано с помощью BCA-анализа белка, который,

помимо выявления белка, чувствителен к присутствию сахаров и пектинов. Не было разницы в используемых буферах для диализа (PBS без кальция/магния, pH 7,4, MES pH 6, Tris pH 8,6).

Фиг. 5A представляет собой схематическую диаграмму, демонстрирующую протокол получения РМР из грейпфрутового сока с использованием соковыжималки с последующим дифференциальным центрифугированием для удаления крупного дебриса, инкубацией с EDTA для снижения образования макромолекул пектина, последовательной фильтрацией для удаления крупных частиц, 5х концентрацией/промывкой TFF, диализом в течение ночи для удаления контаминантов, дальнейшим концентрированием с применением TFF (20х конечная концентрация) и SEC с выделением фракций, содержащих РМР.

Фиг. 5B представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм (A.U.) элюированных фракций SEC грейпфрута с использованием нескольких колонок для SEC. РМР элюируются в ранних фракциях 4-6, а контаминанты элюируются в поздних фракциях.

Фиг. 5C представляет собой график, демонстрирующий концентрацию белка (мкг/мл) в элюированных фракциях SEC грейпфрута с использованием нескольких колонок для SEC. РМР элюируются в ранних фракциях 4-6, а контаминанты элюируются в поздних фракциях.

Фиг. 5D представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм (A.U.) элюированных фракций SEC лимона с использованием нескольких колонок для SEC. РМР элюируются в ранних фракциях 4-6, а контаминанты элюируются в поздних фракциях.

Фиг. 5E представляет собой график, демонстрирующий концентрацию белка (мкг/мл) в элюированных фракциях SEC лимона с использованием нескольких колонок для SEC. РМР элюировали в ранних фракциях 4-6, а контаминанты элюировали в поздних фракциях.

Фиг. 5F представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие размер частиц во фракциях SEC, содержащих РМР грейпфрута, после стерилизации с использованием фильтра с диаметром ячеек 0,22 мкм. На верхней панели представлена диаграмма рассеяния частиц в объединенных фракциях SEC, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Нижняя панель представляет собой график распределения гейтированных частиц по размеру (нм) (за вычетом фона). Концентрацию РМР (частиц/мл) и медианный размер (нм) определяли с использованием стандартов, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 5G представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие размер частиц во фракциях SEC, содержащих РМР лимона, после стерилизации с использованием фильтра с диаметром ячеек 0,22 мкм. На верхней панели представлена диаграмма рассеяния частиц в объединенных фракциях SEC, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Нижняя панель представляет собой график

распределения гейтированных частиц по размеру (нм) (за вычетом фона). Концентрацию РМР (частиц/мл) и медианный размер (нм) определяли с использованием стандартов, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 5H представляет собой график, демонстрирующий стабильность РМР грейпфрута и лимона при 4° по Цельсию, определенную по концентрации РМР (РМР-частицы/мл) в различные моменты времени (дни после получения), как измерено с помощью NanoFCM.

Фиг. 5I представляет собой гистограмму, демонстрирующую стабильность РМР лимона (LM) после одного цикла замораживания-оттаивания при -20° по Цельсию и -20° по Цельсию по сравнению с РМР лимона при хранении при 4° по Цельсию, как определено по концентрации РМР (РМР-частицы/мл) после одной недели хранения при указанных температурах, как измерено с помощью NanoFCM.

Фиг. 6A представляет собой график, демонстрирующий концентрацию частиц (частицы/мл) в элюированных фракциях SEC культуры растительных клеток линии BMS, измеренную с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). РМР элюировали во фракциях SEC 4-6..

Fig. 6B представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм (A.U.) в элюированных фракциях SEC BMS, измеренное на спектрофотометре SpectraMax®. РМР элюировали во фракциях 4-6; фракции 9-13 содержали контаминанты.

Fig. 6C представляет собой график, демонстрирующий концентрацию белка (мкг/мл) в элюированных фракциях SEC BMS, определенную с помощью ВСА-анализа. РМР элюировали во фракциях 4-6; фракции 9-13 содержали контаминанты.

Фиг. 6D представляет собой диаграмму рассеяния, демонстрирующую частицы в объединенных фракциях SEC, содержащих РМР BMS, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Концентрацию РМР (частицы/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 6E представляет собой график, демонстрирующий распределение РМР BMS по размеру (нм) для гейтированных частиц (за вычетом фона) из фиг. 6D. Медианный размер РМР (нм) определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 7A представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие DyLight800nm-меченые РМР грейпфрута, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Верхняя панель представляет собой диаграмму рассеяния частиц в объединенных фракциях SEC. Концентрацию РМР ($4,44 \times 10^{12}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Нижняя панель представляет собой график распределения DyLight800-РМР грейпфрута по размеру (нм). Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер DyLight800-РМР грейпфрута составлял 72,6

нм +/- 14,6 нм (SD).

Фиг. 7B представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие DyLight800nm-меченые РМР лимона, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Медианную концентрацию РМР ($5,18 \times 10^{12}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Нижняя панель представляет собой график распределения DyLight800-РМР грейпфрута по размеру (нм). Размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер DyLight800-РМР лимона составлял 68,5 нм +/- 14 нм (SD).

Фиг. 7C представляет собой гистограмму, демонстрирующую захват DyL800nm-меченых РМР, полученных из грейпфрута и лимона, бактериями (*E. coli* и *P. aeruginosa*) и дрожжами (*S. cerevisiae*) через 2 часа после обработки. Захват определяли по относительной интенсивности флуоресценции (A.U.), нормализованной по относительной интенсивности флуоресценции контрольных микроорганизмов, обработанных только красителем.

Фиг. 8A представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие очищенные РМР лимона (объединенные и осажденные фракции SEC РМР), как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Верхняя панель представляет собой диаграмму рассеяния частиц в объединенных фракциях SEC. Конечную концентрацию РМР лимона ($1,53 \times 10^{13}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Нижняя панель представляет собой график распределения очищенных РМР лимона по размеру (нм). Нижняя панель представляет собой график распределения гейтированных частиц по размеру (нм). Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер РМР лимона составлял 72,4 нм +/- 19,8 нм (SD).

Фиг. 8B представляет собой диаграмму рассеяния и график, демонстрирующие Alexa Fluor® 488-(AF488)-меченые РМР лимона, как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Верхняя панель представляет собой диаграмму рассеяния. Частицы гейтировали на основе сигнала флуоресценции FITC относительно немеченых частиц и фонового сигнала. Эффективность мечения составляла 99%, как определено по количеству флуоресцентных частиц относительно общего количества выявленных частиц. Конечную концентрацию AF488-РМР ($1,34 \times 10^{13}$ РМР/мл) определяли по количеству флуоресцентных частиц и с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, с известной концентрацией в соответствии с инструкциями NanoFCM. Нижняя панель представляет собой график распределения AF488-меченых РМР лимона по размеру (нм). Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер РМР лимона составлял 72,1 нм +/- 15,9 нм (SD).

Fig. 9A представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм

(A.U.) в элюированных фракциях SEC грейпфрута, полученных с применением различных колонок для SEC (колонки А, В, С, D и E), измеренное на спектрофотометре SpectraMax®. РМР элюировали во фракциях 4-6.

Фиг. 9В представляет собой диаграмму рассеяния, демонстрирующую очищенные РМР грейпфрута (объединенные и осажденные фракции SEC РМР), как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Конечную концентрацию РМР грейпфрута ($6,34 \times 10^{12}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 9С представляет собой график, демонстрирующий распределение очищенных РМР грейпфрута по размеру (нм). Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер РМР грейпфрута составлял 63,7 нм +/- 11,5 нм (SD).

Fig. 9D представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм (A.U.) элюированных фракций SEC лимона с применением различных колонок для SEC, измеренное на спектрофотометре SpectraMax®. РМР элюировали во фракциях 4-6.

Фиг. 9Е представляет собой диаграмму рассеяния, демонстрирующую очищенные РМР лимона (объединенные и осажденные фракции SEC РМР), как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Конечную концентрацию РМР лимона ($7,42 \times 10^{12}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 9F представляет собой график, демонстрирующий распределение (нм) очищенных РМР лимона по размеру. Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер РМР лимона составлял 68 нм +/- 17,5 нм (SD).

Фиг. 9G представляет собой гистограмму, демонстрирующую нагрузочную способность DOX (пг DOX на 1000 РМР) РМР лимона (LM) и грейпфрута (GF), которые активно (обработка ультразвуком/экструзия) или пассивно (инкубация) загружали доксорубицином. Нагрузочную способность рассчитывали посредством деления общей концентрации DOX (пг/мл) в образце РМР-DOX (оцененной посредством измерения интенсивности флуоресценции ($E_x/E_m=485/550$ нм) с использованием спектрофотометра SpectraMax®) на общую концентрацию РМР (РМР/мл) в образце.

Фиг. 9H представляет собой график, демонстрирующий стабильность РМР грейпфрута и лимона, нагруженных DOX, при 4° по Цельсию, как определено по концентрации РМР (частицы РМР/мл) в различные моменты времени (дни после загрузки), как измерено с помощью NanoFCM.

Фиг. 10А представляет собой схематическую диаграмму, демонстрирующую протокол получения РМР из 4 литров грейпфрутового сока, обработанного пектиназой и EDTA, концентрированного 5x с использованием TFF 300 кДа, промытого 6 объемами PBS и концентрированного до конечной концентрации 20x. Эксклюзионную

хроматографию использовали для элюирования фракций, содержащих РМР.

Фиг. 10В представляет собой график, демонстрирующий поглощение при 280 нм (A.U.) элюированных фракций SEC с применением 9 различных колонок для SEC (колонка для SEC A-J). РМР элюируют во фракциях SEC 3-7.

Фиг. 10С представляет собой график, демонстрирующий концентрацию белка (мкг/мл) в элюированных фракциях SEC с применением 9 различных колонок для SEC (колонка для SEC A-J). РМР элюируют во фракциях SEC 3-7. Стрелка указывает на фракцию, содержащую контаминанты.

Фиг. 10D представляет собой диаграмму рассеяния, демонстрирующую очищенные РМР грейпфрута (объединенные и осажденные фракции SEC РМР), как измерено с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM). Конечную концентрацию РМР грейпфрута ($7,56 \times 10^{12}$ РМР/мл) определяли с использованием стандарта, представляющего собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 10Е представляет собой график, демонстрирующий распределение очищенных РМР грейпфрута по размеру (нм). Медианный размер РМР определяли с использованием стандартов Echo, представляющих собой гранулы, в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер РМР грейпфрута составлял 70,3 нм +/- 12,4 нм (SD).

Фиг. 10F представляет собой график, демонстрирующий цитотоксический эффект обработки *P. aeruginosa* с помощью РМР грейпфрута, нагруженных доксорубицином (DOX). Бактерии обрабатывали с помощью РМР-DOX в двух повторностях до эффективной концентрации DOX, составляющей 0 (отрицательный контроль), 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Измерение кинетики поглощения при 600 нм осуществляли (спектрофотометр SpectraMax®) для контроля OD культур в указанные моменты времени. Все значения OD на дозу обработки сначала нормализовали до OD в первом моменте времени при этой дозе для нормализации просачивания флуоресценции DOX при 600 нм при высокой концентрации. Для определения цитотоксического эффекта РМР-DOX в отношении бактерий в каждой группе обработки определяли относительную OD по сравнению с необработанным контролем (принятым за 100%).

Фиг. 10G представляет собой график, демонстрирующий цитотоксический эффект обработки *E. coli* с помощью РМР грейпфрута, нагруженных доксорубицином (DOX). Бактерии обрабатывали с помощью РМР-DOX в двух повторностях до эффективной концентрации DOX, составляющей 0 (отрицательный контроль), 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Измерение кинетики поглощения при 600 нм осуществляли (спектрофотометр SpectraMax®) для контроля OD культур в указанные моменты времени. Все значения OD на дозу обработки сначала нормализовали до OD в первом моменте времени при этой дозе для нормализации просачивания флуоресценции DOX при 600 нм при высокой концентрации. Для определения цитотоксического эффекта РМР-DOX в отношении бактерий в каждой группе обработки определяли относительную OD по сравнению с необработанным контролем (принятым за 100%).

Фиг. 10Н представляет собой график, демонстрирующий цитотоксический эффект обработки *S. cerevisiae* с помощью РМР грейпфрута, нагруженных доксорубицином (DOX). Дрожжевые клетки обрабатывали с помощью РМР-DOX в двух повторностях до эффективной концентрации DOX, составляющей 0 (отрицательный контроль), 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Измерение кинетики поглощения при 600 нм осуществляли (спектрофотометр SpectraMax®) для контроля OD культур в указанные моменты времени. Все значения OD на дозу обработки сначала нормализовали до OD в первом моменте времени при этой дозе для нормализации просачивания флуоресценции DOX при 600 нм при высокой концентрации. Для определения цитотоксического эффекта РМР-DOX в отношении дрожжей в каждой группе обработки определяли относительную OD по сравнению с необработанным контролем (принятым за 100%).

Фиг. 11 представляет собой график, демонстрирующий люминесценцию (RLU, относительная единица люминесценции) бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, которых обрабатывали ультрачистой водой (отрицательный контроль), 3 нг не содержащего люциферазы белка (контроль только с белком) или эффективной дозой белка люциферазы, составляющей 3 нг, с использованием нагруженных белком люциферазой РМР (РМР-Лус) в дублированных образцах в течение 2 часов при RT. Белок люциферазы в супернатанте и осажденных бактериях измеряли по люминесценции с использованием набора для анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega) и измеряли на спектрофотометре SpectraMax®.

Подробное описание

В данном документе предусмотрены композиции и связанные способы контроля патогенов, основанные на композициях для контроля патогенов, которые содержат пакеты-мессенджеры растений (РМР), липидные сборки, полученные полностью или частично из растительных внеклеточных везикул (EV) или их сегментов, частей или экстрактов. РМР могут обладать противопатогенной (например, средство, пригодное для введения животным для лечения инфекции, например, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, противопаразитарное средство или нематоцидное средство), пестицидной или репеллентной активностью против насекомых без включения дополнительных средств, однако могут быть необязательно модифицированы с включением дополнительных противопатогенных, пестицидных или репеллентных средств против насекомых. Также включены составы, в которых РМР предусмотрены в практически чистой форме или концентрированных формах. Композиции для контроля патогенов и составы, описанные в данном документе, можно доставлять непосредственно животному для лечения или предупреждения инфекций, вызываемых патогенами. Дополнительно или альтернативно, композиции для контроля патогенов можно доставлять по отношению ко многим патогенам животных или переносчикам патогенов животных для уменьшения приспособленности патогена или его переносчика, контролируя тем самым распространение опасных патогенов.

I. Композиции для контроля патогенов

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, содержат совокупность пакетов-мессенджеров растений (РМР). РМР представляет собой липидную (например, из бислоя липидов, униламеллярную или мультиламеллярную структуру) структуру, которая содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт (например, липидный экстракт). Растительные EV относятся к замкнутой структуре из бислоя липидов, которая в природе встречается в растении. Диаметр РМР может составлять приблизительно 5-2000 нм. Растительные EV могут происходить из различных путей биогенеза растений. В природе растительные EV могут быть обнаружены во внутриклеточных и внеклеточных компартментах растений, таких как растительный апопласт, компартмент, расположенный снаружи плазматической мембраны и образованный континуумом клеточных стенок и внеклеточным пространством. В качестве альтернативы РМР могут быть представлять собой обогащенные растительные EV, обнаруженные в средах для культивирования клеток при секреции из растительных клеток. Растительные EV могут быть отделены от растений (например, от апопластной жидкости), с получением таким образом РМР с помощью ряда способов, дополнительно описанных в данном документе.

Композиции для контроля патогенов могут содержать РМР, которые обладают противопатогенной активностью (например, противобактериальной, противогрибковой, противонематоцидной, противопаразитарной или противовирусной активностью), пестицидной активностью или репеллентной активностью против патогенов, без дополнительного включения дополнительных противопатогенных, пестицидных или репеллентных средств. Однако РМР могут дополнительно содержать гетерологичное средство для контроля патогенов, например, противопатогенное средство (например, противобактериальное, противогрибковое, противонематоцидное, противопаразитарное или противовирусное), пестицидное средство или репеллентное средство, которые можно вводить *in vivo* или *in vitro*. Таким образом, РМР могут содержать вещество с противопатогенной, пестицидной активностью, которое загружается в РМР или на него с помощью растения, из которого получен РМР. Например, гетерологичное функциональное средство, загруженное в РМР *in vivo*, может представлять собой фактор, эндогенный по отношению к растению, или фактор, экзогенный по отношению к растению (например, экспрессируемый с помощью гетерологичной генетической конструкции в генетически сконструированном растении). В качестве альтернативы РМР могут быть загружены гетерологичным функциональным средством *in vitro* (например, после получения с помощью различных способов, дополнительно описанных в данном документе).

РМР могут содержать растительные EV или их сегменты, части или экстракты, диаметр растительных EV в которых составляет приблизительно 5-2000 нм. Например, РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет приблизительно 5-50 нм, приблизительно 50-100 нм, приблизительно 100-150 нм, приблизительно 150-200 нм, приблизительно 200-250 нм,

приблизительно 250-300 нм, приблизительно 300-350 нм, приблизительно 350-400 нм, приблизительно 400-450 нм, приблизительно 450-500 нм, приблизительно 500-550 нм, приблизительно 550-600 нм, приблизительно 600-650 нм, приблизительно 650-700 нм, приблизительно 700-750 нм, приблизительно 750-800 нм, приблизительно 800-850 нм, приблизительно 850-900 нм, приблизительно 900-950 нм, приблизительно 950-1000 нм, приблизительно 1000-1250 нм, приблизительно 1250-1500 нм, приблизительно 1500-1750 нм или приблизительно 1750-2000 нм. В некоторых случаях РМР содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет приблизительно 5-950 нм, приблизительно 5-900 нм, приблизительно 5-850 нм, приблизительно 5-800 нм, приблизительно 5-750 нм, приблизительно 5-700 нм, приблизительно 5-650 нм, приблизительно 5-600 нм, приблизительно 5-550 нм, приблизительно 5-500 нм, приблизительно 5-450 нм, приблизительно 5-400 нм, приблизительно 5-350 нм, приблизительно 5-300 нм, приблизительно 5-250 нм, приблизительно 5-200 нм, приблизительно 5-150 нм, приблизительно 5-100 нм, приблизительно 5-50 нм или приблизительно 5-25 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 50-200 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 50-300 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 200-500 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 30-150 нм.

В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет по меньшей мере 5 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 150 нм, по меньшей мере 200 нм, по меньшей мере 250 нм, по меньшей мере 300 нм, по меньшей мере 350 нм, по меньшей мере 400 нм, по меньшей мере 450 нм, по меньшей мере 500 нм, по меньшей мере 550 нм, по меньшей мере 600 нм, по меньшей мере 650 нм, по меньшей мере 700 нм, по меньшей мере 750 нм, по меньшей мере 800 нм, по меньшей мере 850 нм, по меньшей мере 900 нм, по меньшей мере 950 нм или по меньшей мере 1000 нм. В некоторых случаях РМР содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет менее чем 1000 нм, менее чем 950 нм, менее чем 900 нм, менее чем 850 нм, менее чем 800 нм, менее чем 750 нм, менее 700 нм, менее чем 650 нм, менее чем 600 нм, менее чем 550 нм, менее чем 500 нм, менее чем 450 нм, менее чем 400 нм, менее чем 350 нм, менее чем 300 нм, менее чем 250 нм, менее чем 200 нм, менее чем 150 нм, менее чем 100 нм или менее чем 50 нм. Для измерения диаметра частиц растительных EV или их сегмента, части или экстракта можно применять различные способы (например, способ динамического светорассеяния), стандартные в данной области.

В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средняя площадь поверхности которых составляет от 77 нм² до

$3,2 \times 10^6 \text{ нм}^2$ (например, $77\text{-}100 \text{ нм}^2$, $100\text{-}1000 \text{ нм}^2$, $1000\text{-}1 \times 10^4 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^4\text{-}1 \times 10^5 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^5\text{-}1 \times 10^6 \text{ нм}^2$ или $1 \times 10^6\text{-}3,2 \times 10^6 \text{ нм}^2$). В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний объем которых составляет от 65 нм^3 до $5,3 \times 10^8 \text{ нм}^3$ (например, $65\text{-}100 \text{ нм}^3$, $100\text{-}1000 \text{ нм}^3$, $1000\text{-}1 \times 10^4 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^4\text{-}1 \times 10^5 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^5\text{-}1 \times 10^6 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^6\text{-}1 \times 10^7 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^7\text{-}1 \times 10^8 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^8\text{-}5,3 \times 10^8 \text{ нм}^3$). В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, среднюю площадь поверхности которых составляет по меньшей мере 77 нм^2 , (например, по меньшей мере 77 нм^2 , по меньшей мере 100 нм^2 , по меньшей мере 1000 нм^2 , по меньшей мере $1 \times 10^4 \text{ нм}^2$, по меньшей мере $1 \times 10^5 \text{ нм}^2$, по меньшей мере $1 \times 10^6 \text{ нм}^2$ или по меньшей мере $2 \times 10^6 \text{ нм}^2$). В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний объем которых составляет по меньшей мере 65 нм^3 (например, по меньшей мере 65 нм^3 , по меньшей мере 100 нм^3 , по меньшей мере 1000 нм^3 , по меньшей мере $1 \times 10^4 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $1 \times 10^5 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $1 \times 10^6 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $1 \times 10^7 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $1 \times 10^8 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $2 \times 10^8 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $3 \times 10^8 \text{ нм}^3$, по меньшей мере $4 \times 10^8 \text{ нм}^3$ или по меньшей мере $5 \times 10^8 \text{ нм}^3$).

В некоторых случаях РМР может иметь тот же размер, что и растительная EV или ее сегмент, экстракт или часть. В качестве альтернативы РМР может иметь размер, отличный от размера исходной растительной EV, из которой получен РМР. Например, диаметр РМР может составлять приблизительно $5\text{-}2000 \text{ нм}$. Например, средний диаметр РМР может составлять приблизительно $5\text{-}50 \text{ нм}$, приблизительно $50\text{-}100 \text{ нм}$, приблизительно $100\text{-}150 \text{ нм}$, приблизительно $150\text{-}200 \text{ нм}$, приблизительно $200\text{-}250 \text{ нм}$, приблизительно $250\text{-}300 \text{ нм}$, приблизительно $300\text{-}350 \text{ нм}$, приблизительно $350\text{-}400 \text{ нм}$, приблизительно $400\text{-}450 \text{ нм}$, приблизительно $450\text{-}500 \text{ нм}$, приблизительно $500\text{-}550 \text{ нм}$, приблизительно $550\text{-}600 \text{ нм}$, приблизительно $600\text{-}650 \text{ нм}$, приблизительно $650\text{-}700 \text{ нм}$, приблизительно $700\text{-}750 \text{ нм}$, приблизительно $750\text{-}800 \text{ нм}$, приблизительно $800\text{-}850 \text{ нм}$, приблизительно $850\text{-}900 \text{ нм}$, приблизительно $900\text{-}950 \text{ нм}$, приблизительно $950\text{-}1000 \text{ нм}$, приблизительно $1000\text{-}1200 \text{ нм}$, приблизительно $1200\text{-}1400 \text{ нм}$, приблизительно $1400\text{-}1600 \text{ нм}$, приблизительно $1600\text{-}1800 \text{ нм}$ или приблизительно $1800\text{-}2000 \text{ нм}$. В некоторых случаях средний диаметр РМР может составлять по меньшей мере 5 нм , по меньшей мере 50 нм , по меньшей мере 100 нм , по меньшей мере 150 нм , по меньшей мере 200 нм , по меньшей мере 250 нм , по меньшей мере 300 нм , по меньшей мере 350 нм , по меньшей мере 400 нм , по меньшей мере 450 нм , по меньшей мере 500 нм , по меньшей мере 550 нм , по меньшей мере 600 нм , по меньшей мере 650 нм , по меньшей мере 700 нм , по меньшей мере 750 нм , по меньшей мере 800 нм , по меньшей мере 850 нм , по меньшей мере 900 нм , по меньшей мере 950 нм , по меньшей мере 1000 нм , по меньшей мере 1200 нм , по меньшей мере 1400 нм , по меньшей мере 1600 нм , по меньшей мере 1800 нм или приблизительно 2000 нм . Для измерения диаметра частиц РМР можно использовать различные способы (например, способ динамического светорассеяния), стандартные в данной области техники. В некоторых случаях размер РМР определяют после загрузки гетерологичных функциональных средств или после других модификаций РМР.

В некоторых случаях средняя площадь поверхности РМР может составлять от 77 нм² до $1,3 \times 10^7$ нм² (например, 77-100 нм², 100-1000 нм², 1000- 1×10^4 нм², 1×10^4 - 1×10^5 нм², 1×10^5 - 1×10^6 нм² или 1×10^6 - $1,3 \times 10^7$ нм²). В некоторых случаях средний объем РМР может составлять от 65 нм³ до $4,2 \times 10^9$ нм³ (например, 65-100 нм³, 100-1000 нм³, 1000- 1×10^4 нм³, 1×10^4 - 1×10^5 нм³, 1×10^5 - 1×10^6 нм³, 1×10^6 - 1×10^7 нм³, 1×10^7 - 1×10^8 нм³, 1×10^8 - 1×10^9 нм³ или 1×10^9 - $4,2 \times 10^9$ нм³). В некоторых случаях средняя площадь поверхности РМР составляет по меньшей мере 77 нм², (например, по меньшей мере 77 нм², по меньшей мере 100 нм², по меньшей мере 1000 нм², по меньшей мере 1×10^4 нм², по меньшей мере 1×10^5 нм², по меньшей мере 1×10^6 нм² или по меньшей мере 1×10^7 нм²). В некоторых случаях средний объем РМР составляет по меньшей мере 65 нм³ (например, по меньшей мере 65 нм³, по меньшей мере 100 нм³, по меньшей мере 1000 нм³, по меньшей мере 1×10^4 нм³, по меньшей мере 1×10^5 нм³, по меньшей мере 1×10^6 нм³, по меньшей мере 1×10^7 нм³, по меньшей мере 1×10^8 нм³, по меньшей мере 1×10^9 нм³, по меньшей мере 2×10^9 нм³, по меньшей мере 3×10^9 нм³ или по меньшей мере 4×10^9 нм³).

В некоторых случаях РМР может содержать интактную растительную EV. В качестве альтернативы РМР может содержать сегмент, часть или экстракт с полной площадью поверхности везикулы (например, сегмент, часть или экстракт, содержащие менее чем 100% (например, менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем более 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1%) от полной площади поверхности везикулы) растительной EV. Сегмент, часть или экстракт могут иметь любую форму, такую как круговой сегмент, сферический сегмент (например, полусфера), криволинейный сегмент, линейный сегмент или плоский сегмент. В случаях, когда сегмент представляет собой сферический сегмент везикулы, сферический сегмент может представлять собой сегмент, который образуется в результате расщепления сферической везикулы вдоль пары параллельных линий, или сегмент, который возникает в результате расщепления сферической везикулы вдоль пары непараллельных линий. Соответственно, совокупность РМР может содержать совокупность интактных растительных EV, совокупность сегментов, частей или экстрактов растительных EV или смесь интактных растительных EV и сегментов растительных EV. Специалисту в данной области техники будет понятно, что соотношение интактных и сегментированных растительных EV будет зависеть от конкретного применяемого способа выделения. Например, гомогенизация или измельчение растения или его части могут привести к образованию РМР, которые содержат более высокий процент сегментов, частей или экстрактов растительных EV, чем при неструктурном способе экстракции, таком как вакуумная инфльтрация.

В случаях, когда РМР содержит сегмент, часть или экстракт растительной EV, сегмент, часть или экстракт EV могут иметь меньшую среднюю площадь поверхности, чем у интактной везикулы, например, среднюю площадь поверхности, составляющую менее чем 77 нм², 100 нм², 1000 нм², 1×10^4 нм², 1×10^5 нм², 1×10^6 нм² или $3,2 \times 10^6$ нм²). В некоторых случаях площадь поверхности сегмента, части или экстракта EV составляет

менее чем 70 нм^2 , 60 нм^2 , 50 нм^2 , 40 нм^2 , 30 нм^2 , 20 нм^2 или 10 нм^2). В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, который имеет меньший средний объем, чем средний объем интактной везикулы, например, средний объем, составляющий менее чем 65 нм^3 , 100 нм^3 , 1000 нм^3 , $1 \times 10^4 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^5 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^6 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^7 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^8 \text{ нм}^3$ или $5,3 \times 10^8 \text{ нм}^3$).

В случаях когда РМР содержит экстракт растительной EV, например, в случаях когда РМР содержит липиды, экстрагированные (например, с помощью хлороформа) из растительной EV, - РМР может содержать по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или больше липидов, экстрагированных (например, с помощью хлороформа) из растительной EV. РМР в совокупности могут содержать сегменты растительной EV и/или липиды, экстрагированные из растительной EV, или их смесь.

Далее в данном документе описаны подробности, относящиеся к способам получения РМР, маркеров растительной EV, которые могут быть ассоциированы с РМР, и составов для композиций, содержащих РМР.

А. Способы получения

РМР можно получать из растительных EV или их сегментов, частей или экстрактов (например, липидного экстракта), которые встречаются в природе в растениях или их частях, включая растительные ткани или растительные клетки. Иллюстративный способ получения РМР предусматривает (а) получение исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV; и (b) выделение фракции неочищенных РМР из исходного образца, где фракция неочищенных РМР содержит пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце. (c) Способ может дополнительно предусматривать дополнительную стадию (с), предусматривающую очистку фракции неочищенных РМР с получением таким образом совокупности чистых РМР, при этом совокупность чистых РМР содержит пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV. . Каждый этап получения более подробно обсуждается ниже. Иллюстративные способы, относящиеся к выделению и очистке РМР можно найти, например, в Rutter and Innes, *Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017; Rutter et al, *Bio. Protoc.* 7(17): e2533, 2017; Regente et al, *J of Exp. Biol.* 68(20): 5485-5496, 2017; Mu et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, 58, 1561-1573, 2014 и Regente et al, *FEBS Letters.* 583: 3363-3366, 2009, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Например, совокупность РМР может быть выделена из растения с помощью способа, который предусматривает стадии: (а) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV; (b) выделения фракции неочищенных РМР из исходного образца, где фракция неочищенных РМР содержит пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце

(например, уровень, который понижен на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%); и (с) очистки фракции неочищенных РМР с получением таким образом совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР содержит пониженный уровень по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV (например, уровень, который понижен на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%).

РМР, предусмотренные в данном документе, могут содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, выделенные из множества растений. РМР могут быть выделены из любых родов растений (сосудистых или несосудистых), включая без ограничения покрытосеменные (однодольные и двудольные растения), голосеменные, папоротники, селлагинеллы, хвощи, псилофиты, ликофиты, водоросли (например, одноклеточные или многоклеточные, например, архепластидовые) или мхи. В определенных случаях РМР могут быть получены из сосудистого растения, например, однодольных, двудольных или голосеменных. Например, РМР могут быть получены из люцерны, яблони, растения рода *Arabidopsis*, банана, ячменя, канолы, клещевины, цикория, хризантемы, клевера, какао, кофе, хлопчатника, семени хлопчатника, кукурузы, крамбе, клюквы, огурца, дендробиума, диоскореи, эвкалипта, овсяницы, льна, гладиолуса, растения семейства лилейные, семени льна, проса, дыни, горчицы, овса, масличной пальмы, масличного рапса, папайи, арахиса, ананаса, декоративных растений, фасоли, картофеля, рапса, риса, ржи, райграсса, сафлора, кунжута, сорго, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, клубники, табака, томата, газонной травы, пшеницы или овощных культур, таких как салат, сельдерей, брокколи, цветная капуста, тыквенные культуры; плодовых и ореховых деревьев, таких как яблоня, груша, персик, апельсин, грейпфрут, лимон, лайм, миндаль, пекан, грецкий орех, лещина; вьющихся растений, таких как виноград, киви, хмель; плодовых кустарников и колючих кустарников, таких как малина, ежевика, крыжовник; лесных деревьев, таких как ясень, сосна, пихта, клен, дуб, каштан, тополь; с люцерной, канолой, клещевиной, кукурузой, хлопчатником, крамбе, льном, семенем льна, горчицей, масличной пальмой, масличным рапсом, арахисом, картофелем, рисом, сафлором, кунжутом, соей, сахарной свеклой, подсолнечником, табаком, томатом или пшеницей.

РМР могут быть получены из цельного растения (например, целых розеток или проростков) или, в качестве альтернативы, из одной или нескольких частей растения (например, листа, семени, корня, плода, овоща, пыльцы, флоэмного сока или ксилемного сока). Например, РМР могут быть получены из вегетативных органов/структур побегов (например, листьев, стеблей или клубней), корней, цветков и органов/структур цветков (например, пыльцы, прицветников, чашелистиков, лепестков, тычинок, плодолистиков, пыльников или семяпочек), семени (включая зародыш, эндосперм или семенную оболочку), плода (зрелой завязи), сока (например, флоэмного или ксилемного сока),

растительной ткани (например, сосудистой ткани, основной паренхимы, опухолевой ткани и т. п.) и клеток (например, отдельных клеток, протопластов, зародышей, каллусной ткани, замыкающих клеток, яйцеклеток и т. п.) или их потомства. Например, стадия выделения может включать (а) получение растения или его части. В некоторых примерах часть растения представляет собой лист растения рода *Arabidopsis*. Растение может находиться на любой стадии развития. Например, РМР можно получать из проростков, например, проростков возрастом 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель (например, проростков растения рода *Arabidopsis*). Другие иллюстративные РМР могут включать РМР, полученные из корней (например, корней имбиря), фруктового сока (например, грейпфрутового сока), овощей (например, брокколи), пыльцы (например, пыльцы оливкового дерева), флоэмного сока (например, флоэмного сока растения рода *Arabidopsis*) или ксилемного сока (например, ксилемного сока растения томата).

РМР могут быть получены из растения или его части с помощью различных способов. Любой способ, который позволяет высвобождать апопластную фракцию растения, содержащую EV, или иную внеклеточную фракцию, которая содержит РМР, содержащие секретлируемые EV (например, среды для культивирования клеток), является подходящим в способах по настоящему изобретению. EV можно высвободить с помощью деструктивных (например, гомогенизация или измельчение растения или любой части растения) или недеструктивных (промывка или вакуумная инфльтрация растения или любой части растения) способов. Например, растение или его часть могут быть подвергнуты вакуумной инфльтрации, гомогенизации, измельчению или их комбинации для выделения EV из растения или части растения с получением таким образом РМР. Например, стадия выделения может включать (b) выделение фракции неочищенных РМР из исходного образца (например, растения, части растения или образца, полученного из растения или части растения), где стадия выделения включает вакуумную инфльтрацию растения (например, с буфером для выделения везикул) для высвобождения и сбора апопластной фракции. Альтернативно, стадия выделения может предусматривать (b) получение растения или его части, где стадия высвобождения включает гомогенизацию или измельчение растения с высвобождением EV, с получением тем самым РМР.

После выделения растительных EV с получением таким образом РМР, РМР можно отделять или собирать во фракции неочищенных РМР (например, апопластной фракции). Например, стадия отделения может включать отделение от совокупности РМР фракции неочищенных РМР с помощью центрифугирования (например, дифференциального центрифугирования или ультрацентрифугирования) и/или фильтрации для отделения фракции, содержащей РМР, от крупных контаминантов, включая дебрис растительных тканей, растительных клеток или органелл растительных клеток (например, ядер, митохондрий или хлоропластов). Таким образом, фракция неочищенных EV растения будет содержать пониженное количество крупных контаминантов, включая, например, дебрис растительных тканей, растительных клеток или органелл растительных клеток

(например, ядер, митохондрий или хлоропластов) по сравнению с исходным образцом из исходного растения или части растения.

Неочищенная фракция РМР может быть дополнительно очищена с помощью дополнительных способов очистки для получения совокупности чистых РМР. Например, фракция неочищенных РМР может быть отделена от других растительных компонентов с помощью ультрацентрифугирования, например, с использованием градиента плотности (йодиксанол или сахароза), разделения по размеру и/или использования других подходов для удаления агрегированных компонентов (например, осаждения или эксклюзионной хроматографии). Полученные чистые РМР могут содержать пониженный уровень контаминантов (например, одного или нескольких компонентов, отличных от РМР, таких как белковые агрегаты, агрегаты нуклеиновых кислот, агрегаты белок-нуклеиновая кислота, свободные липопротеины, липидопротеиновые структуры, ядра, компоненты клеточной стенки, клеточные органеллы или их комбинацию) по сравнению с одной или несколькими фракциями, полученными в ходе более ранних стадий разделения, или по сравнению с предварительно установленным пороговым уровнем, например, спецификацией коммерческого выпуска. Например, чистые РМР могут содержать пониженный уровень (например, на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более чем на 100%; или в приблизительно 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, в 100 раз или более чем в 100 раз) растительных органелл или компонентов клеточной стенки по сравнению с уровнем в исходном образце. В некоторых случаях чистые РМР практически не содержат (например, содержат не выявляемые уровни) одного или нескольких компонентов, отличных от РМР, таких как белковые агрегаты, агрегаты нуклеиновых кислот, агрегаты белок-нуклеиновая кислота, свободные липопротеины, липидопротеиновые структуры, ядра, компоненты клеточной стенки, клеточные органеллы или их комбинации. Дополнительные примеры стадий высвобождения и разделения можно найти в примере 1. Концентрация РМР может составлять, например, 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} или более 1×10^{13} РМР/мл.

Например, белковые агрегаты могут быть удалены из выделенных РМР. Например, раствор выделенных РМР может быть получен с использованием диапазона значений pH (например, при измерении с помощью pH-зонда) с осаждением белковых агрегатов в растворе. Значение pH может быть доведено, например, до pH 3, pH 5, pH 7, pH 9 или pH 11 посредством добавления, например, гидроксида натрия или хлороводородной кислоты. Как только раствор достигнет указанного значения pH, его можно фильтровать для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы раствор выделенных РМР можно флокулировать с применением добавления заряженных полимеров, таких как Polymin-P или Praestol 2640. Вкратце, к раствору добавляют Polymin-P или Praestol 2640 и перемешивают лопастной мешалкой. Затем раствор можно фильтровать с удалением твердых частиц. В качестве альтернативы агрегаты можно солубилизовать посредством

повышения концентрации соли. Например, NaCl можно добавлять к раствору выделенных РМР до тех пор, пока его концентрация не составит, например, 1 моль/л. Затем раствор можно фильтровать с выделением РМР. В качестве альтернативы агрегаты солюбилизируют посредством повышения температуры. Например, выделенные РМР можно нагревать при перемешивании до тех пор, пока раствор не достигнет однородной температуры, например, 50°C, в течение 5 минут. Затем смесь РМР можно фильтровать с выделением РМР. В качестве альтернативы растворимые контаминанты из растворов РМР можно отделять с помощью эксклюзионной хроматографической колонки в соответствии со стандартными процедурами, где РМР элюируются в первых фракциях, в то время как белки, рибонуклеопротеины и некоторые липопротеины элюируются позже. Эффективность удаления белковых агрегатов можно определять путем измерения и сравнения концентрации белка до и после удаления белковых агрегатов с помощью количественного определения белка с помощью ВСА/метода Бредфорда.

Любой из способов получения, описанных в данном документе, может быть дополнен любыми количественными или качественными способами, известными из уровня техники, для характеристики или идентификации РМР на любой стадии способа получения. РМР могут быть охарактеризованы с помощью различных способов анализа для оценки выхода РМР, концентрации РМР, чистоты РМР, состава РМР или размеров РМР. РМР можно оценивать с помощью ряда способов, известных из уровня техники, которые позволяют визуализировать, количественно или качественно охарактеризовать (например, идентификация состава) РМР, таких как микроскопия (например, трансмиссионная электронная микроскопия), динамическое светорассеяние, отслеживание наночастиц, спектроскопия (например, инфракрасный анализ с преобразованием Фурье) или масс-спектрометрия (анализ белков и липидов). В определенных случаях способы (например, масс-спектрометрия) можно применять для идентификации маркеров растительных EV, присутствующих на РМР, таких как маркеры, раскрытые в приложении. Для облегчения анализа и характеристики фракции РМР могут быть дополнительно помечены или окрашены. Например, РМР могут быть окрашены с помощью йодида 3,3'-дигексилосакарбодиамина (DIOC₆), флуоресцентного липофильного красителя, PKH67 (Sigma Aldrich); Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific) или DyLight™ 800 (Thermo Fisher). В отсутствие усложненных форм отслеживания наночастиц этот относительно простой подход позволяет количественно оценить общее содержание мембран и может применяться для опосредованного измерения концентрации РМР (Rutter and Innes, *Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017; Rutter et al, *Bio. Protoc.* 7(17): e2533, 2017). Для более точных измерений и для оценки распределения РМР по размеру можно использовать отслеживание наночастиц или настраиваемое резистивное импульсное зондирование.

В ходе процесса получения РМР необязательно могут быть получены таким образом, чтобы РМР имели повышенную концентрацию (например, на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%; или в приблизительно 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз или более

чем 100 раз) по сравнению с уровнем EV в контрольном или исходном образце. Выделенные РМР могут составлять от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% композиции для контроля патогенов, например, от приблизительно 0,01% до приблизительно 100%, от приблизительно 1% до приблизительно 99,9%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 99% или от приблизительно 75% до приблизительно 100%. В некоторых случаях композиция включает в себя по меньшей мере любое количество из 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или больше РМР, например, как измерено по вес./об., процентному содержанию белков РМР в композиции и/или процентному содержанию липидов в композиции (например, посредством измерения флуоресцентно меченых липидов); см., например, пример 3). В некоторых случаях концентрированные средства используются в качестве коммерческих продуктов, например, конечный потребитель может использовать разбавленные средства, которые имеют значительно более низкую концентрацию активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления композицию составляют в виде концентрированного состава для контроля патогенов, например, концентрированного состава сверхмалого объема.

Как проиллюстрировано в примере 1, РМР могут быть получены из множества растений или их частей (например, апопласта листа, апопласта семян, корня, плода, овоща, пыльцы, флоэмного или ксилемного сока). Например, РМР могут быть выделены из апопластной фракции растения, такой как апопласт листа (например, апопласт листьев *Arabidopsis thaliana*) или апопласт семян (например, апопласт семян подсолнечника). Другие иллюстративные РМР получают из корней (например, корней имбиря), фруктового сока (например, грейпфрутового сока), овощей (например, брокколи), пыльцы (например, пыльцы оливкового дерева), флоэмного сока (например, флоэмного сока растения рода *Arabidopsis*), ксилемного сока (например, ксилемного сока растения томата) или супернатанта культуры клеток (например, супернатанта культуры клеток табака BY2). Этот пример дополнительно демонстрирует получение РМР из этих различных растительных источников.

Как проиллюстрировано в примере 2, РМР можно очищать различными способами, например, с использованием градиента плотности (йодиксанол или сахароза) в сочетании с ультрацентрифугированием и/или способами удаления агрегированных контаминантов, например, осаждением или эксклюзионной хроматографией. Например, в примере 2 проиллюстрирована очистка РМР, которые были получены посредством стадий разделения, описанных в примере 1. Кроме того, РМР можно охарактеризовать в соответствии со способами, проиллюстрированными в примере 3.

В некоторых случаях РМР из композиций и способов по настоящему изобретению можно выделять из растения или его части и использовать без дальнейшей модификации РМР. В других случаях РМР может быть изменен перед использованием, как описано далее в данном документе.

В. Маркеры растительных EV

PMP из композиций и способов по настоящему изобретению могут содержать ряд маркеров, которые позволяют идентифицировать PMP как полученные из растительной EV и/или содержащие ее сегмент, часть или экстракт. Используемый в данном документе термин "маркер растительной EV" относится к компоненту, который естественным образом ассоциирован с растением и включен в растительную EV или на нее *in planta*, такому как растительный белок, растительная нуклеиновая кислота, растительное низкомолекулярное соединение, растительный липид или их комбинация. Примеры маркеров растительных EV можно найти, например, в Rutter and Innes, *Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017; Raimondo et al., *Oncotarget.* 6(23): 19514, 2015; Ju et al., *Mol. Therapy.* 21(7):1345-1357, 2013; Wang et al., *Molecular Therapy.* 22(3): 522-534, 2014; и Regente et al., *J of Exp. Biol.* 68(20): 5485-5496, 2017; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Дополнительные примеры маркеров растительных EV перечислены в приложении и дополнительно описаны в данном документе.

Маркер растительной EV может включать растительный липид. Примеры растительных липидных маркеров, которые можно обнаружить в PMP, включают фитостерин, кампестерин, β -ситостерин, стигмастерин, авенастерин, гликозилинозитолфосфорилцерамиды (GIPC), гликолипиды (например, моногалактозилдиацилглицерин (MGDG) или дигалактозилдиацилглицерин (DGDG)) или их комбинацию. Например, PMP может содержать GIPC, которые представляют собой основной класс сфинголипидов в растениях и являются одними из наиболее распространенных мембранных липидов в растениях. Другие маркеры растительных EV могут включать липиды, которые накапливаются в растениях в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы (например, бактериальную или грибковую инфекцию), такие как фосфатидная кислота (PA) или фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P).

В качестве альтернативы маркер растительной EV может включать растительный белок. В некоторых случаях белковый маркер растительной EV может представлять собой противомикробный белок, продуцируемый растениями в естественных условиях, включая защитные белки, которые растения секретируют в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы (например, бактериальную или грибковую инфекцию). Растительные защитные белки, используемые для защиты от патогенов, включают растворимые белки семейства рецепторного белка, представляющего собой белок, ассоциированный с фактором, чувствительным к N-этилмалемиду (SNARE) (например, синтаксин-121 (SYP121; № доступа в GenBank: NP_187788.1 или NP_974288.1), Penetration1 (PEN1; № доступа в GenBank: NP_567462.1)) или ABC-транспортер Penetration3 (PEN3; № доступа в GenBank: NP_191283.2). Другие примеры маркеров растительных EV включают белки, которые облегчают транспорт РНК на большие расстояния в растениях, включая белки флоэмы (например, белок флоэмы 2-A1 (PP2-A1), номер доступа в GenBank: NP_193719.1), кальций-зависимые липидсвязывающие белки или лектины (например, родственные джакалину лектины, например, джакалин *Helianthus annuus* (Helja; №

доступа в GenBank: ANZ86978.1). Например, РНК-связывающий белок может представлять собой богатый глицином РНК-связывающий белок 7 (GRP7; номер доступа в GenBank: NP_179760.1). Кроме того, белки, которые регулируют функцию плазмодесм, в некоторых случаях могут встречаться в растительных EV, включая белки, такие как синаптотагмин А А (номер доступа в GenBank: NP_565495.1). В некоторых случаях маркер растительной EV может включать белок, участвующий в метаболизме липидов, такой как фосфолипаза С или фосфолипаза D. В некоторых случаях белковый маркер растительной EV представляет собой белок клеточного транспорта в растениях. В определенных случаях, когда маркер растительной EV представляет собой белок, белковый маркер может не иметь сигнального пептида, который обычно ассоциирован с секреторируемыми белками. Нестандартные секреторные белки, по-видимому, имеют несколько общих свойств, таких как (i) отсутствие лидерной последовательности, (ii) отсутствие РТМ, специфических для ER или аппарата Гольджи, и/или (iii) секреция, на которую не оказывает влияния брэфельдин А, который блокирует классический зависимый от ER/аппарата Гольджи путь секреции. Специалист в данной области техники может использовать различные общедоступные средства (например, базу данных SecretomeP; SUBA3 (база данных субклеточной локализации белков растений рода *Arabidopsis*)) для оценки белка в отношении сигнальной последовательности или ее отсутствия.

В случаях, когда маркер растительной EV представляет собой белок, белок может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с маркером растительной EV, таким как любой из маркеров растительных EV, перечисленных в приложении. Например, белок может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с PEN1 из *Arabidopsis thaliana* (номер доступа в GenBank: NP_567462.1).

В некоторых случаях маркер растительной EV включает нуклеиновую кислоту, кодируемую растениями, например, растительную РНК, растительную ДНК или растительную PNA. Например, РМР может содержать dsRNA, мРНК, вирусную РНК, микроРНК (miRNA) или малую интерферирующую РНК (siRNA), кодируемые растением. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, которая ассоциирована с белком, который облегчает транспорт РНК на большие расстояния в растениях, как обсуждается в данном документе. В некоторых случаях маркер растительной EV на основе нуклеиновой кислоты может участвовать в индуцированном хозяином сайленсинге генов (HIGS), который представляет собой процесс, с помощью которого растения подавляют чужеродные транскрипты вредителей растений (например, патогенов, таких как грибы). Например, нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет гены бактерий или грибов.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота может представлять собой микроРНК, такую как miR159 или miR166, которая нацеливается на гены грибкового патогена (например, *Verticillium dahliae*). В некоторых случаях белок может представлять собой белок, участвующий в переносе растительных защитных соединений, такой как белки, участвующие в транспорте и метаболизме глюкозинолатов (GSL), включая транспортер-1 -1 глюкозинолатов (GTR1; № доступа в GenBank: NP_566896.2), транспортер-2 глюкозинолатов (GTR2; NP_201074.1) или эпителиоспецифический модификатор 1 (ESM1; NP_188037.1).

В случаях, когда маркер растительной EV представляет собой нуклеиновую кислоту, нуклеиновая кислота может иметь нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с маркером растительной EV, например, с последовательностями, кодирующими маркеры растительных EV, перечисленные в приложении. Например, нуклеиновая кислота может иметь полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с miR159 или miR166.

В некоторых случаях маркер растительной EV включает соединение, продуцируемое растениями. Например, соединение может представлять собой защитное соединение, продуцируемое в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы, такое как вторичные метаболиты. Одними из таких вторичных метаболитов, которые можно обнаружить в РМР, являются глюкозинолаты (GSL), которые представляют собой азот- и серосодержащие вторичные метаболиты, встречающиеся главным образом в растениях семейства Brassicaceae. Другие вторичные метаболиты могут включать аллелохимические вещества.

В некоторых случаях РМР также может быть идентифицирован как полученный из растительных EV на основании отсутствия определенных маркеров (например, липидов, полипептидов или полинуклеотидов), которые, как правило, не продуцируются растениями, но обычно ассоциированы с другими организмами (например, маркеры животных EV, растительных EV, бактериальных EV или грибковых EV). Например, в некоторых случаях РМР не содержит липидов, которые обычно встречаются в животных EV, бактериальных EV или грибковых EV. В некоторых случаях РМР не содержит липидов, типичных для животных EV (например, сфингомиелина). В некоторых случаях РМР не содержит липидов, типичных для бактериальных EV или бактериальных мембран (например, LPS). В некоторых случаях РМР не содержит липидов, типичных для мембран грибов (например, эргостерин).

Маркеры растительных EV могут быть идентифицированы с использованием любых подходов, известных из уровня техники, которые позволяют идентифицировать низкомолекулярные соединения (например, масс-спектрометрия, масс-спектрометрия), липиды (например, масс-спектрометрия, масс-спектрометрия), белки (например, масс-

спектроскопия, иммуноблоттинг) или нуклеиновые кислоты (например, ПЦР-анализ). В некоторых случаях композиция на основе РМР, описанная в данном документе, содержит выявляемое количество, например, предварительно определенное пороговое количество маркера растительной EV, описанного в данном документе.

С. Загрузка средств

РМР может быть модифицирован с включением гетерологичного функционального средства, например, средства для контроля патогенов или репеллентного средства, такого как средства, описанные в данном документе. РМР может нести такие средства или может быть ассоциирован с ними с помощью различных способов для обеспечения доставки средства целевому растению или вредителю растения, например, посредством инкапсулирования средства, включения компонента в структуру из бислоя липидов или ассоциации компонента (например, посредством конъюгации) с поверхностью структуры РМР из бислоя липидов.

Гетерологичное функциональное средство может быть включено или загружено в или на РМР с помощью любых способов, известных из уровня техники, которые обеспечивают, непосредственно или опосредованно, ассоциацию РМР и средства. Гетерологичные функциональные средства можно включать в РМР с помощью способа *in vivo* (например, *in planta*, например, посредством получения РМР из трансгенного растения, содержащего гетерологичное средство) или *in vitro* (например, в культуре ткани или в культуре клеток), или с помощью способов как *in vivo*, так и *in vitro*.

В случаях когда РМР загружены гетерологичным функциональным средством (например, средством для контроля патогенов или репеллентом) *in vivo*, - РМР можно получать из EV или ее сегмента, части или экстракта, которые были загружены *in planta*, в культуре ткани или в культуре клеток. Способы *in planta* предусматривают экспрессию гетерологичного функционального средства (например, средства для контроля патогенов или репеллентного средства) в растении, которое было генетически модифицировано для экспрессии гетерологичного функционального средства. В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство является экзогенным для растения. В качестве альтернативы, гетерологичное функциональное средство может встречаться в растении в природе, но экспрессироваться на повышенном уровне по сравнению с уровнем, встречающимся в растении, которое не было генетически модифицировано.

В некоторых случаях РМР можно загружать *in vitro*. Вещество может быть загружено на РМР или в него (например, может быть инкапсулировано) с использованием без ограничения физических, химических и/или биологических способов. Например, гетерологичное функциональное средство можно вводить в РМР с помощью одного или нескольких из электропорации, обработки ультразвуком, пассивной диффузии, перемешивания, экстракции липидов или экструзии. Загруженные РМР можно оценивать для подтверждения присутствия или уровня загруженного средства с помощью различных способов, таких как HPLC (например, для оценки низкомолекулярных соединений); иммуноблоттинг (например, для оценки белков); и количественная ПЦР (например, для

оценки нуклеотидов). Однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, что загрузка представляющего интерес вещества в РМР не ограничивается проиллюстрированными выше способами.

В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство может быть конъюгировано с РМР, в котором гетерологичное функциональное средство связано или присоединено, опосредованно или непосредственно, к РМР. Например, одно или несколько средств для контроля патогенов могут быть химически связаны с РМР таким образом, что одно или несколько средств для контроля патогенов присоединяются (например, посредством ковалентных или ионных связей) непосредственно к бислою липидов РМР. В некоторых случаях конъюгация различных средств для контроля патогенов с РМР может быть достигнута посредством изначального смешивания одного или нескольких гетерологичных функциональных средств с подходящим сшивающим средством (например, N-этилкарбодиимидом ("EDC"), которое обычно используется в качестве карбоксил-активирующего средства для образования амидной связи с первичными аминами, а также реагирует с фосфатными группами) в подходящем растворителе. После периода инкубации, достаточного для обеспечения присоединения гетерологичного функционального средства к сшивающему средству, смесь сшивающего средства/гетерологичного функционального средства затем можно объединить с РМР и после еще одного периода инкубации подвергнуть воздействию градиента сахарозы (например, 8, 30, 45 и 60% градиента сахарозы) для отделения свободного гетерологичного функционального средства и свободных РМР от средств для контроля патогенов, конъюгированных с РМР. В качестве части объединения смеси с градиентом сахарозы и сопутствующей стадии центрифугирования, РМР, конъюгированные со средствами для контроля патогенов, затем наблюдаются в виде полосы в градиенте сахарозы таким образом, что конъюгированные РМР могут быть собраны, промыты и растворены в подходящем растворе для применения, как описано в данном документе.

В некоторых случаях РМР стабильно ассоциирован с гетерологичным функциональным средством до и после доставки РМР, например, растению или вредителю. В других случаях РМР ассоциирован с гетерологичным функциональным средством таким образом, что гетерологичное функциональное средство становится диссоциированным от РМР после доставки РМР, например, растению или вредителю.

РМР может быть дополнительно модифицирован другими компонентами (например, липидами, например, стеринами, например, холестерином; или низкомолекулярными соединениями) для дальнейшего изменения функциональных и структурных характеристик РМР. Например, РМР можно дополнительно модифицировать с помощью стабилизирующих молекул, которые повышают стабильность РМР (например, в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре, и/или стабильны в течение по меньшей мере одной недели при 4°C).

РМР могут быть загружены различными концентрациями гетерологичного функционального средства в зависимости от конкретного средства или применения.

Например, в некоторых случаях РМР загружают таким образом, что композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, содержит приблизительно 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 95 (или любой диапазон от приблизительно 0,001 до 95) или больше вес. % средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства. В некоторых случаях РМР загружают таким образом, что композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, включает в себя приблизительно 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,0, 0,1, 0,01, 0,001 (или любой диапазон от приблизительно 95 до 0,001) или меньше вес. % средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства. Например, композиция для контроля патогенов может содержать от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01 вес. %, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 вес. %, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 вес. %, от приблизительно 1 до приблизительно 5 вес. % или от приблизительно 5 до приблизительно 10 вес. %, от приблизительно 10 до приблизительно 20 вес. % средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства. В некоторых случаях РМР может быть загружен приблизительно 1, 5, 10, 50, 100, 200, или 500, 1,000, 2,000 (или любой диапазон от приблизительно 1 до 2000) или больше мкг/мл средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства. Липосома по настоящему изобретению может быть загружена приблизительно 2,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1 (или любой диапазон от приблизительно 2000 до 1) или менее мкг/мл средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства.

В некоторых случаях РМР загружены таким образом, что композиция для контроля патогенов, раскрытая в данном документе, содержит по меньшей мере 0,001 вес. %, по меньшей мере 0,01 вес. %, по меньшей мере 0,1 вес. %, по меньшей мере 1,0 вес. %, по меньшей мере 2 вес. %, по меньшей мере 3 вес. %, по меньшей мере 4 вес. %, по меньшей мере 5 вес. %, по меньшей мере 6 вес. %, по меньшей мере 7 вес. %, по меньшей мере 8 вес. %, по меньшей мере 9 вес. %, по меньшей мере 10 вес. %, по меньшей мере 15 вес. %, по меньшей мере 20 вес. %, по меньшей мере 30 вес. %, по меньшей мере 40 вес. %, по меньшей мере 50 вес. %, по меньшей мере 60 вес. %, по меньшей мере 70 вес. %, по меньшей мере 80 вес. %, по меньшей мере 90 вес. % или по меньшей мере 95 вес. % средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства. В некоторых случаях РМР может быть загружен по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 500 мкг/мл, по меньшей мере 1000 мкг/мл, по меньшей мере 2000 мкг/мл средства для контроля патогенов и/или репеллентного средства.

Примеры конкретных средств для контроля патогенов и/или репеллентных средств, которые могут быть загружены в РМР, дополнительно описаны в разделе под названием "Гетерологические функциональные средства".

D. Фармацевтические составы

В настоящий документ включены композиции для контроля патогенов, которые

могут быть составлены в фармацевтические композиции, например, для введения животному. Фармацевтическую композицию можно вводить животному с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем и/или вспомогательным веществом. В зависимости от способа введения и дозировки фармацевтическая композиция, применяемая в способах, описанных в данном документе, будет составлена в фармацевтические композиции, подходящие для обеспечения легкой доставки. При необходимости, однократная доза может находиться в форме единичной дозы.

Композицию для контроля патогенов можно составлять, например, для перорального введения, внутривенного введения (например, инъекция или инфузия) или подкожного введения животному. Для инъекционных составов из уровня техники известны различные эффективные фармацевтические носители (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed., (2012) и ASHP Handbook on Injectable Drugs, 18th ed., (2014)).

Фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества в настоящих композициях являются нетоксичными для их получателей в используемых дозировках и концентрациях. Приемлемые носители и вспомогательные вещества могут включать буферы, такие как фосфатный, цитратный, HEPES и TAE, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин, консерванты, такие как хлорид гексаметония, хлорид октадецилдиметилбензиламмония, резорцин и хлорид бензалкония, белки, такие как сывороточный альбумин человека, желатин, декстран и иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза и сорбит. Композиции могут быть составлены в соответствии с обычной фармацевтической практикой. Концентрация соединения в составе будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая дозировку вводимого действующего вещества (например, РМР) и пути введения.

Для перорального введения животному композицию для контроля патогенов можно получить в форме состава для перорального применения. Составы для перорального применения могут включать таблетки, капли, капсулы, сиропы или жидкие лекарственные формы для перорального применения, содержащие активный(-ые) ингредиент(-ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу, сорбит, сахар, маннит, микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, карбонат кальция, хлорид натрия, лактозу, фосфат кальция, сульфат кальция или фосфат натрия); гранулирующие и средство для улучшения распадаемости (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, кроскармеллозу натрия, альгинаты или альгиновую кислоту); связывающие средства (например, сахарозу, глюкозу, сорбит, аравийскую камедь, альгиновую кислоту, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинированный крахмал,

микросталлическую целлюлозу, алюмосиликат магния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль); а также смазывающие средства, средства, способствующие скольжению, и антиадгезионные смазки (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированное растительное масло или тальк). Другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут являться красителями, ароматизаторами, пластификаторами, увлажнителями, буферными средствами и т. п. Составы для перорального применения также можно получать в единичной лекарственной форме, в виде жевательных таблеток, нежевательных таблеток, каплет, капсул (например, в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водной или масляной средой). Раскрытые в данном документе композиции могут также дополнительно включать состав с немедленным высвобождением, замедленным высвобождением или отсроченным высвобождением.

Для парентерального введения животным композиции для контроля патогенов можно составлять в форме жидких растворов или суспензий и вводить парентеральным путем (например, подкожно, внутривенно или внутримышечно). Фармацевтическую композицию можно составлять для инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции для парентерального введения можно составлять с использованием стерильного раствора или любой фармацевтически приемлемой жидкости в качестве несущей среды. Фармацевтически приемлемые несущие среды включают без ограничения стерильную воду, физиологический раствор или среду для культивирования клеток (например, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), α -модифицированную среду Игла (α -MEM), среду F-12). Способы получения лекарственных препаратов известны из уровня техники, см., например, Gibson (ed.) *Pharmaceutical Preformulation and Formulation* (2nd ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2009).

Е. Составы для использования в сельском хозяйстве

В настоящий документ включены композиции для контроля патогенов, которые могут быть составлены в композиции для использования в сельском хозяйстве, например, для введения патогену или переносчику патогенов (например, насекомому). Фармацевтическую композицию можно вводить патогену или переносчику патогенов (например, насекомому) с приемлемым в сельском хозяйстве разбавителем, носителем и/или вспомогательным веществом. Дополнительные примеры составов для использования в сельском хозяйстве, применимых в настоящих композициях и способах, дополнительно описаны в данном документе.

Для облегчения нанесения, обработки, транспортировки, хранения и достижения максимальной активности действующее вещество, в данном случае РМР, может быть составлено с другими веществами. РМР могут быть составлены, например, в виде приманок, концентрированных эмульсий, пылевидных препаратов, эмульгируемых

концентратов, фумигантов, гелей, гранул, микроинкапсулированных препаратов, обработок семян, суспензионных концентратов, суспензий, таблеток, водорастворимых жидкостей, диспергируемых в воде гранул или сухих текучих составов, смачиваемых порошков и растворов сверхмалого объема. Для получения дополнительной информации о типах составов см. "Catalogue of Pesticide Formulation Types and International Coding System" Technical Monograph n° 2, 5th Edition by CropLife International (2002).

Действующие вещества (например, РМР с гетерологичными функциональными средствами или без них, например, противопатогенными средствами, пестицидными средствами или репеллентными средствами) можно применять чаще всего в виде водных суспензий или эмульсий, полученных из концентрированных составов таких средств. Такие водорастворимые, суспендируемые в воде или эмульгируемые составы представляют собой либо твердые вещества, обычно известные как смачиваемые порошки, или диспергируемые в воде гранулы, или жидкости, обычно известные как эмульгируемые концентраты, или водные суспензии. Смачиваемые порошки, которые можно компактизировать с образованием диспергируемых в воде гранул, содержат однородную смесь пестицида, носителя и поверхностно-активных веществ. Носитель обычно выбран из аттапульгитовых глин, монтмориллонитовых глин, диатомитовых земель или очищенных силикатов. Эффективные поверхностно-активные вещества, содержащие от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% смачиваемого порошка, встречаются среди сульфированных лигнинов, конденсированных нафталинсульфонатов, нафталинсульфонатов, алкилбензолсульфонатов, алкилсульфатов и неионных поверхностно-активных веществ, таких как аддукты этиленоксида и алкилфенолов.

Эмульгируемые концентраты могут содержать подходящую концентрацию РМР, например, от приблизительно 50 до приблизительно 500 грамм на литр жидкости, растворенных в носителе, который представляет собой либо смешивающийся с водой растворитель, либо смесь не смешивающегося с водой органического растворителя и эмульгаторов. Пригодные органические растворители включают ароматические соединения, особенно ксилолы, и нефтяные фракции, особенно нафталиновые и олефиновые части нефти с высокой температурой кипения, такие как тяжелая ароматическая нефть. Можно также использовать другие органические растворители, такие как терпеновые растворители, в том числе производные канифоли, алифатические кетоны, такие как циклогексанон, и сложные спирты, такие как 2-этоксиэтанол. Подходящие эмульгаторы для эмульгируемых концентратов выбраны из обычных анионных и неионных поверхностно-активных веществ.

Водные суспензии включают суспензии нерастворимых в воде пестицидов, диспергированных в водном носителе в концентрации в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 50% по весу. Суспензии получают посредством тонкой гомогенизации пестицида и его интенсивного перемешивания с носителем, состоящим из воды и поверхностно-активных веществ. Ингредиенты, такие как неорганические соли и

синтетические или натуральные камеди, также можно добавлять для повышения плотности и вязкости водного носителя.

РМР также можно применять в виде гранулированных композиций, которые особенно пригодны для внесения в почву. Гранулированные композиции обычно содержат от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по весу пестицида, диспергированного в носителе, который содержит глину или подобное вещество. Такие композиции обычно получают посредством растворения состава в подходящем растворителе и нанесения его на гранулированный носитель, который был предварительно сформирован для достижения соответствующего размера частиц в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 3 мм. Такие композиции также можно составлять посредством получения тестообразной массы или пасты из носителя и соединения, а также измельчения и высушивания с получением гранулированных частиц необходимого размера.

Пылевидные препараты, содержащие состав РМР по настоящему изобретению, получают посредством тщательного перемешивания РМР в порошкообразной форме с подходящим пылевидным носителем, приемлемым для применения с точки зрения сельского хозяйства, таким как каолиновая глина, гомогенизированная вулканическая порода и т. п. В подходящем случае пылевидные препараты могут содержать от приблизительно 1% до приблизительно 10% пакетов. Их можно применять для протравливания семян или для нанесения на листья с помощью опыливателя.

В равной степени практичным является применение состава по настоящему изобретению в форме раствора в подходящем органическом растворителе, обычно в нефтяном масле, таком как масла для опрыскивания, которые широко используются в сельскохозяйственной химии.

РМР также можно применять в форме аэрозольной композиции. В таких композициях пакеты растворены или диспергированы в носителе, который представляет собой создающую давление пропеллентную смесь. Аэрозольная композиция упакована в контейнер, из которого смесь распределяется через распылительный клапан.

Другой вариант осуществления представляет собой эмульсию типа масло-в-воде, где эмульсия включает масляные глобулы, каждая из которых имеет ламеллярное жидкокристаллическое покрытие и диспергирована в водной фазе, где каждая масляная глобула включает по меньшей мере одно соединение, которое является активным с точки зрения сельского хозяйства, и индивидуально покрыта моноламеллярным или олиголамеллярным слоем, содержащим: (1) по меньшей мере одно неионное липофильное поверхностно-активное средство, (2) по меньшей мере одно неионное гидрофильное поверхностно-активное средство и (3) по меньшей мере одно ионное поверхностно-активное средство, где глобулы имеют средний диаметр частиц, составляющий менее чем 800 нанометров. Дополнительная информация о варианте осуществления раскрыта в публикации патента США 20070027034, опубликованной 1 февраля 2007 г. Для простоты использования этот вариант осуществления будет называться "OIWE".

Кроме того, как правило, когда описанные выше молекулы используются в составе, такой состав также может содержать другие компоненты. Эти компоненты включают без ограничения (т. е., это не исчерпывающий и не исключаящий список) смачиватели, распределители, клеящие вещества, вещества, обеспечивающие проникновение, буферы, секвестрирующие средства, средства для снижения сноса, средства, обеспечивающие совместимость, средства, препятствующие пенообразованию, чистящие средства и эмульгаторы. Сразу описаны некоторые компоненты.

Смачивающее средство представляет собой вещество, которое при добавлении к жидкости повышает способность жидкости растекаться или ее проникающую способность за счет снижения межфазного натяжения между жидкостью и поверхностью, по которой она растекается. Смачивающие средства используются для двух основных функций в агрохимических составах: в ходе обработки и изготовления для повышения скорости смачивания порошков в воде для получения концентратов растворимых жидкостей или суспензионных концентратов; и в ходе смешивания продукта с водой в распылительном резервуаре для уменьшения времени смачивания смачиваемых порошков и улучшения проникновения воды в диспергируемые в воде гранулы. Примеры смачивающих средств, используемых в составах на основе смачиваемых порошков, суспензионных концентратов и диспергируемых в воде гранул, представляют собой лаурилсульфат натрия; диоктилсульфосукцинат натрия; этоксилаты алкилфенола; и этоксилаты алифатических спиртов.

Диспергирующее средство представляет собой вещество, которое адсорбируется на поверхности частиц, способствует сохранению состояния дисперсности частиц и предупреждает их повторную агрегацию. Диспергирующие средства добавляют к агрохимическим составам для облегчения диспергирования и суспендирования в ходе изготовления и для обеспечения повторного диспергирования частиц в воде в распылительном резервуаре. Они широко используются в смачиваемых порошках, суспензионных концентратах и диспергируемых в воде гранулах. Поверхностно-активные вещества, которые используются в качестве диспергирующих средств, обладают способностью сильно адсорбироваться на поверхности частиц и обеспечивать заряженный или стерический барьер для повторной агрегации частиц. Наиболее часто используемыми поверхностно-активными веществами являются анионные, неионные или смеси двух типов. Для составов на основе смачиваемых порошков наиболее распространенными диспергирующими средствами являются лигносульфонаты натрия. Для суспензионных концентратов очень хорошая адсорбция и стабилизация достигаются с использованием полиэлектролитов, таких как конденсаты формальдегида и нафталинсульфоната натрия. Также используются сложные эфиры фосфорной кислоты и этоксилата тристирилфенола. Неионные вещества, такие как конденсаты алкиларилэтиленоксида и блок-сополимеры EO-PO, иногда комбинируют с анионными веществами в качестве диспергирующих средств для суспензионных концентратов. В последние годы в качестве диспергирующих средств были разработаны новые типы полимерных поверхностно-активных веществ с

очень высоким молекулярным весом. Они имеют очень длинные гидрофобные "остовы" и большое количество этиленоксидных цепей, образующих "зубцы" "гребешка" поверхностно-активного вещества. Эти высокомолекулярные полимеры могут обеспечивать очень высокую долговременную стабильность суспензионных концентратов, поскольку гидрофобные остовы имеют много точек прикрепления к поверхностям частиц. Примеры диспергирующих средств, используемых в агрохимических составах, представляют собой лигносульфонаты натрия; конденсаты формальдегида и нафталинсульфоната натрия; сложные эфиры фосфорной кислоты и этоксилата тристирилфенола; этоксилаты алифатических спиртов; алкилэтоксилаты; блок-сополимеры ЕО-РО (этиленоксид - пропиленоксид); и привитые сополимеры.

Эмульгирующее средство представляет собой вещество, которое стабилизирует суспензию капель одной жидкой фазы в другой жидкой фазе. Без эмульгирующего средства две жидкости разделились бы на две несмешивающиеся жидкие фазы. Наиболее часто используемые смеси эмульгаторов содержат алкилфенол или алифатический спирт с двенадцатью или более звеньями этиленоксида и маслорастворимую кальциевую соль додецилбензолсульфоновой кислоты. Диапазон значений гидрофильно-липофильного баланса ("HLB") от 8 до 18 обычно обеспечивает получение высокостабильных эмульсий. Стабильность эмульсии иногда может быть улучшена посредством добавления небольшого количества поверхностно-активного вещества, представляющего собой блок-сополимер ЕО-РО.

Солюбилизующее средство представляет собой поверхностно-активное вещество, которое будет образовывать мицеллы в воде при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования. Затем мицеллы способны растворять или солюбилизировать нерастворимые в воде материалы внутри гидрофобной части мицеллы. Типы поверхностно-активных веществ, обычно используемых для солюбилизации, представляют собой неионные вещества, моноолеаты сорбитана, этоксилаты моноолеатов сорбитана и сложные эфиры метилолеата.

Иногда используют поверхностно-активные вещества, либо отдельно, либо с другими добавками, такими как минеральные или растительные масла, в качестве вспомогательных средств к смесям в распылительных резервуарах для улучшения биологических свойств пестицида в отношении мишени. Типы поверхностно-активных веществ, используемых для биоусиления, обычно зависят от природы и механизма действия пестицида. Однако они часто представляют собой неионные вещества, такие как алкилэтоксилаты; этоксилаты линейных алифатических спиртов; этоксилаты алифатических аминов.

Носитель или разбавитель в составе для использования в сельском хозяйстве представляет собой материал, добавляемый к пестициду для придания продукту необходимой прочности. Носители обычно представляют собой материалы с высокой абсорбционной способностью, тогда как разбавители обычно представляют собой материалы с низкой абсорбционной способностью. Носители и разбавители используются

в составах на основе пылевидных препаратов, смачиваемых порошков, гранул и диспергируемых в воде гранул.

Органические растворители используются главным образом в составе на основе эмульгируемых концентратов, эмульсий типа масло-в-воде, суспензий и в составах сверхмалого объема, а также, в меньшей степени, в гранулированных составах. Иногда используются смеси растворителей. Первыми основными группами растворителей являются алифатические парафиновые масла, такие как керосин или очищенные парафины. Вторая основная группа (и наиболее распространенная) включает ароматические растворители, такие как ксилол, и более высокомолекулярные фракции C9 и C10 ароматических растворителей. Хлорированные углеводороды пригодны в качестве соразтворителей для предупреждения кристаллизации пестицидов при эмульгировании состава в воде. Спирты иногда используются в качестве соразтворителей для повышения растворяющей способности. Другие растворители могут включать растительные масла, масла из семян и сложные эфиры из растительных масел и масел из семян.

Загустители или гелеобразующие средства используются главным образом в составе на основе суспензионных концентратов, эмульсий и суспензий для изменения реологических свойств или свойств текучести жидкости и предупреждения разделения и осаждения диспергированных частиц или капель. Загустители, гелеобразующие средства и средства, препятствующие осаждению, обычно делятся на две категории, а именно нерастворимые в воде твердые частицы и водорастворимые полимеры. Можно получать составы на основе суспензионных концентратов с использованием глин и диоксидов кремния. Примеры этих типов материалов включают без ограничения монтмориллонит, бентонит, алюмосиликат магния и аттапулгит. Водорастворимые полисахариды использовались в качестве загустителей и гелеобразующих средств в течение многих лет. Наиболее часто используемые типы полисахаридов представляют собой натуральные экстракты семян и морских водорослей или синтетические производные целлюлозы. Примеры этих типов материалов включают без ограничения гуаровую камедь; камедь рожкового дерева; каррагинан; альгинаты; метилцеллюлозу; натрийкарбоксиметилцеллюлозу (SCMC); гидроксипропилцеллюлозу (HPC). Другие типы средств, препятствующих осаждению, основаны на модифицированных крахмалах, полиакрилатах, поливинилово-пирролидон спирте и полиэтиленоксиде. Еще одним хорошим средством, препятствующим осаждению, является ксантановая камедь.

Микроорганизмы могут вызывать порчу составленных продуктов. Поэтому для устранения или снижения их влияния используются консерванты. Примеры таких средств включают без ограничения пропионовую кислоту и ее натриевую соль; сорбиновую кислоту и ее натриевые или калиевые соли; бензойную кислоту и ее натриевую соль; натриевую соль п-гидроксибензойной кислоты; метил-п-гидроксибензоат; и 1,2-бензотиазолин-3-он (BIT).

Присутствие поверхностно-активных веществ часто вызывает пенообразование в составах на водной основе в ходе операций смешивания при получении и при применении

с помощью распылительного резервуара. С целью снижения тенденции к пенообразованию, средства, препятствующие пенообразованию, часто добавляют в ходе стадии изготовления или перед наполнением бутылок. Как правило, существует два типа средств, препятствующих пенообразованию, а именно силиконы и средства на основе, отличной от силиконов. Силиконы обычно представляют собой водные эмульсии диметилполисилоксана, тогда как средства, препятствующие вспениванию, отличные от средств на основе силикона, представляют собой нерастворимые в воде масла, такие как октанол и нонанол, или диоксид кремния. В обоих случаях функция средства, препятствующего пенообразованию, заключается в вытеснении поверхностно-активного вещества с поверхности раздела воздух-вода.

"Экологичные" средства (например, вспомогательные вещества, поверхностно-активные вещества, растворители) могут уменьшать общее экологическое воздействие составов для защиты растительных культур. Экологичные средства являются биоразлагаемыми и обычно образуются из природных и/или пополняемых источников, например, из растительных и животных источников. Конкретными примерами являются: растительные масла, масла из семян и их сложные эфиры, а также алкоксиллированные алкилполиглюкозиды.

В некоторых случаях РМР можно сублимировать или лиофилизировать. См. патент США № 4 311 712. Позднее РМР можно восстанавливать при контакте с водой или другой жидкостью. К лиофилизированным или восстановленным липосомам могут быть добавлены другие компоненты, например, другие противопатогенные средства, пестицидные средства, репеллентные средства, приемлемые с точки зрения сельского хозяйства носители или другие материалы в соответствии с составами, описанными в данном документе.

Другие необязательные особенности композиции включают носители или среды для доставки, которые защищают композицию для контроля патогенов от УФ-излучения и/или кислых условий. В некоторых случаях средство доставки содержит рН-буфер. В некоторых случаях композиция составлена таким образом, что она имеет рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 9,0, включая, например, любой из диапазонов рН от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0.

Композиция может дополнительно содержать аттрактант (например, хемоаттрактант), который привлекает вредителя, такого как переносчик патогенов (например, насекомое), в непосредственной близости от композиции. Аттрактанты включают феромоны, химические вещества, которые секретируются животным, в частности, вредителем, или хемоаттрактанты, которые влияют на поведение или развитие других особей этого же вида. Другие аттрактанты включают сахарные сиропы и сиропы на основе гидролизатов белков, дрожжевые грибы и гниющее мясо. Аттрактанты также можно объединять с активным ингредиентом и распылять на листья или другие предметы в обрабатываемой области. Известны различные аттрактанты, которые влияют на

поведение вредителя, например, поиск вредителем пищи, мест для откладывания яиц или спаривания или партнеров для спаривания. Аттрактанты, пригодные в способах и композициях, описанных в данном документе, включают, например, эвгенол, фенэтилпропионат, этилдиметилизобутилциклопропанкарбоксилат, пропилбензодиоксанкарбоксилат, цис-7,8-эпокси-2-метилоктадекан, транс-8, транс-0-додекадиенол, цис-9-тетрадеценаль (и цис-11-гексадеценаль), транс-11-тетрадеценаль, цис-11-гексадеценаль, (Z)-11,12-гексадекадиеналь, цис-7-додеценилацетат, цис-8-додеценилацетат, цис-9-додеценилацетат, цис-9-тетрадеценилацетат, цис-11-тетрадеценилацетат, транс-11-тетрадеценилацетат (и цис-11), цис-9, транс-11-тетрадекадиенилацетат (и цис-9, транс-12), цис-9, транс-12-тетрадекадиенилацетат, цис-7, цис-11-гексадекадиенилацетат (и цис-7, транс-11), цис-3, цис-13-октадекадиенилацетат, транс-3, цис-13-октадекадиенилацетат, анетол и изоамилсалицилат.

Для получения дополнительной информации о составах для использования в сельском хозяйстве см. "Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations", под редакцией D. A. Knowles, авторское право 1998 г. от Kluwer Academic Publishers. Также см. "Insecticides in Agriculture and Environment-Retrospects and Prospects" A. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya, and R. Perry, авторское право 1998 г. от Springer-Verlag.

II. Терапевтические способы

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, применимы в различных терапевтических способах, в частности, для предупреждения или лечения вызванных патогенами инфекций у животных. Настоящие способы включают доставку композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, по отношению к животному.

В данном документе предусмотрены способы введения по отношению к растению композиции для контроля патогенов, раскрытой в данном документе. Способы могут быть пригодны для лечения или предупреждения вызванных патогенами инфекций у животных.

Например, в данном документе предусмотрен способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, где совокупность РМР включает в себя противогрибковое средство. В некоторых случаях противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена гриба, вызывающего грибковую инфекцию (например, белка усиленного роста нитевидной формы (EFG1)). В некоторых случаях грибковую инфекцию вызывает *Candida albicans*. В некоторых случаях композиция включает в себя РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ ослабляет или в значительной степени устраняет грибковую инфекцию.

В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ лечения животного,

пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, и где совокупность РМР включает в себя противобактериальное средство (например, амфотерицин В). В некоторых случаях бактерия представляет собой вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Pseudomonas*, вид *Shigella*, вид *Salmonella*, вид *Campylobacter* или вид *Escherichia*. В некоторых случаях композиция включает в себя РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ снижает или в значительной степени устраняет бактериальную инфекцию. В некоторых случаях животное представляет собой человека, животное, подлежащее ветеринарному лечению, или животное, относящееся к домашнему скоту.

Настоящие способы применимы для лечения инфекции (например, вызванной патогеном животного) у животного, что относится к применению лечения по отношению к животному, уже страдающему заболеванием, для улучшения или стабилизации состояния животного. Это может включать уменьшение колонизации патогена внутри организма животного, на нем или вокруг него одним или несколькими патогенами (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%) по сравнению с исходным количеством и/или обеспечение пользы для индивидуума (например, уменьшение колонизации в количестве, достаточном для устранения симптомов). В таких случаях подвергнутая лечению инфекция может проявляться в виде уменьшения симптомов (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%). В некоторых случаях подвергнутая лечению инфекция эффективна для увеличения вероятности выживания индивидуума (например, увеличения вероятности выживания на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%) или увеличения общей выживаемости популяции (например, увеличения вероятности выживания на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100%). Например, композиции и способы могут быть эффективными для "существенного устранения" инфекции, что относится к уменьшению инфекции в степени, достаточной для устойчивого устранения симптомов (например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев) у животного.

Настоящие способы применимы для предупреждения инфекции (например, вызванной патогеном животного), что относится к предупреждению увеличения колонизации внутри организма животного, на нем или вокруг него одним или несколькими патогенами (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или больше чем 100% по сравнению с необработанным животным) в количестве, достаточном для поддержания исходной популяции патогенов (например, примерно в количестве, обнаруживаемом у здорового индивидуума), предупреждения начала инфекции и/или предупреждения симптомов или состояний,

связанных с инфекцией. Например, индивидуумы могут получать профилактическое лечение для предупреждения грибковой инфекции при подготовке к инвазивной медицинской процедуре (например, при подготовке к операции, такой как получение трансплантата, терапия стволовыми клетками, трансплантация, протезирование, длительное или частое получение внутривенной катетеризации или получение лечения в отделении интенсивной терапии), у индивидуумов с ослабленным иммунитетом (например, у индивидуумов, страдающих от рака, ВИЧ/СПИДом или принимающих иммунодепрессанты) или у индивидуумов, проходящих длительную терапию антибиотиками.

Композицию для контроля патогенов можно составлять для введения или вводить любым подходящим способом, включая, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, чрескожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь очага поражения, интракраниально, внутрисуставно, интрапростатически, внутривезикулярно, интратрахеально, интратекально, интраназально, интравагинально, интраректально, местно, интратуморально, перитонеально, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардially, внутривисцерально, внутривисцеральным способом, внутривисцерально, перорально, местно, трансдермально, интравитреально (например, посредством интравитреальной инъекции), посредством глазных капель, посредством ингаляции, посредством инъекции, посредством имплантации, посредством инфузии, посредством непрерывной инфузии, посредством непосредственного локализованного перфузионного омывания клеток-мишеней, посредством катетера, посредством лаважа, в виде кремов или в виде липидных композиций. Композиции, используемые в способах, описанных в данном документе, также можно вводить системно или локально. Способ введения может варьироваться в зависимости от различных факторов (например, вводимого соединения или композиции и тяжести состояния, заболевания или расстройства, подлежащих лечению). В некоторых случаях композицию для контроля патогенов вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, внутривисцерально, посредством имплантации, посредством ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. Введение доз может осуществляться любым подходящим путем, например, посредством инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В данном документе предусмотрены различные схемы введения доз, включая без ограничения однократное или многократное введения в различные моменты времени, струйное введение и импульсную инфузию.

Что касается предупреждения или лечения инфекции, описанной в данном документе (при использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), то это будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, степени тяжести и течения заболевания, от того, применяют ли его в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии,

истории болезни пациента и ответа на композицию для контроля патогенов. Композицию для контроля патогенов можно, например, вводить пациенту за один раз или в течение серии курсов лечения. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение, как правило, будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания или пока инфекция не перестанет быть выявляемой. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые две недели (например, так, что пациент получает, например, от приблизительно двух до приблизительно двадцати доз композиции для контроля патогенов. Можно вводить начальную более высокую нагрузочную дозу, а затем одну или несколько более низких доз. Однако могут быть полезны другие схемы введения доз. Прогресс данной терапии легко контролировать с помощью обычных методик и анализов.

В некоторых случаях количество композиции для контроля патогенов, вводимое индивидууму (например, человеку), может находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 г/кг (например, приблизительно 0,01 мг/кг - 0,1 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг - 1 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг-10 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг-100 мг/кг, приблизительно 100 мг/кг - 1 г/кг или приблизительно 1 г/кг- 5 г/кг) веса тела индивидуума. В некоторых случаях количество композиции для контроля патогенов, вводимое индивидууму (например, человеку) составляет по меньшей мере 0,01 мг/кг (например, по меньшей мере 0,01 мг/кг, по меньшей мере 0,1 мг/кг, по меньшей мере 1 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 100 мг/кг, по меньшей мере 1 г/кг или по меньшей мере 5 г/кг) веса тела индивидуума. Дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более чем 7 доз). В некоторых случаях композицию для контроля патогенов, вводимую животному, можно вводить отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим средством или средством для контроля патогенов. Доза антитела, вводимая при комбинированном лечении, может быть снижена по сравнению с однократным лечением. Прогресс данной терапии легко контролировать с помощью обычных методик.

III. Сельскохозяйственные способы

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, применимы в различных сельскохозяйственных способах, в частности, для предупреждения или лечения вызванных патогенами инфекций у животных и для контроля распространения таких патогенов, например, переносчиками патогенов. Настоящие способы включают доставку композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, по отношению к патогену или переносчику патогенов.

Композиции и соответствующие способы можно применять для предупреждения заражения или снижения количества патогенов или переносчиков патогенов в любых средах обитания, в которых они обитают (например, вне организмов животных, например, на растениях, частях растений (например, корнях, плодах и семенах), в почве, в воде или на них или в другой среде обитания патогена или переносчика патогенов. Соответственно, композиции и способы могут снижать повреждающий эффект переносчиков патогенов,

посредством, например, уничтожения, повреждения или замедления активности переносчика, и тем самым могут контролировать распространение патогена среди животных. Композиции, раскрытые в данном документе, можно использовать для контроля, уничтожения, повреждения, паралича или снижения активности одного или нескольких из любых патогенов или переносчиков патогенов на любой стадии развития, например, их яйца, нимфы, личинки, гусениц, взрослых особей, молодых особей или высушенных форм. Подробности каждого из этих способов описаны ниже.

А. Доставка по отношению к патогену

В данном документе предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к патогену, такому как раскрытый в данном документе, посредством приведения патогена в контакт с композицией для контроля патогенов. Способы могут являться полезными для снижения приспособленности патогена, например, для предупреждения или лечения инфекции, вызванной патогеном, или контроля распространения патогена в результате доставки композиции для контроля патогенов. Примеры патогенов, на которые можно воздействовать в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают бактерии (например, виды рода *Streptococcus* spp., *Pneumococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. или *Escherichia* spp.), грибы (*Saccharomyces* spp. или *Candida* spp.), паразитических насекомых (например, *Cimex* spp.), паразитических нематод (например, *Heligmosomoides* spp.) или паразитических простейших (например, *Trichomoniasis* spp.).

Например, в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности патогена, при этом способ включает доставку по отношению к патогену любой из композиций, описанных в данном документе, где способ снижает приспособленность патогена по сравнению с необработанным патогеном. В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где патоген растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение. В некоторых случаях способов, описанных в данном документе, композицию доставляют в виде пригодной для питания патогена композиции для поглощения патогеном. В некоторых случаях способов, описанных в данном документе, композицию доставляют (например, патогену) в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

Также в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, где совокупность РМР включает в себя инсектицидное средство. Например, паразитическим насекомым может являться постельный клоп. В данном документе предусмотрены другие неограничивающие примеры паразитических насекомых. В некоторых случаях способ снижает приспособленность паразитического

насекомого по сравнению с необработанным паразитическим насекомым.

Дополнительно в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, где совокупность РМР включает в себя нематоцидное средство. Например, паразитической нематодой является *Heligmosomoides polygyrus*. В данном документе предусмотрены другие неограничивающие примеры паразитических нематод. В некоторых случаях способ снижает приспособленность паразитической нематоды по сравнению с необработанной паразитической нематодой.

Дополнительно в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, где совокупность РМР включает в себя противопаразитарное средство. Например, паразитическим простейшим может являться *T. vaginalis*. В данном документе предусмотрены другие неограничивающие примеры паразитических простейших. В некоторых случаях способ снижает приспособленность паразитического простейшего по сравнению с необработанным паразитическим простейшим.

Снижение приспособленности патогена в результате доставки композиции для контроля патогенов может проявляться различными путями. В некоторых случаях снижение приспособленности патогена может проявляться в виде ухудшения или снижения физиологических функций патогена (например, ухудшение состояния организма или выживаемости) в результате доставки композиции для контроля патогенов. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена с помощью одного или нескольких параметров, включая без ограничения скорость воспроизводства, фертильность, продолжительность жизни, жизнеспособность, подвижность, репродуктивную способность, развитие патогена, вес тела, скорость метаболизма или активность или выживаемость по сравнению с патогеном, которому не вводили композицию для контроля патогенов. Например, способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения общего состояния патогена или для снижения общей выживаемости патогена. В некоторых случаях снижение выживаемости патогена составляет приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у патогена, который не получает композицию для контроля патогенов. В некоторых случаях способы и композиции эффективны для снижения размножения патогена (например, скорости

размножения, фертильности) по сравнению с патогеном, которому не вводили композицию для контроля патогенов. В некоторых случаях способы и композиции эффективны для снижения других физиологических параметров, таких как подвижность, вес тела, продолжительность жизни, репродуктивная способность или скорость метаболизма, на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у патогена, который не получает композицию для контроля патогенов).

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде повышения восприимчивости патогена к противопатогенному средству и/или снижения устойчивости патогена к противопатогенному средству по сравнению с патогеном, которому не доставляли композицию для контроля патогенов. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для повышения восприимчивости патогена к средству для контроля патогенов на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у вредителя, который не получает композицию для контроля патогенов).

В некоторых случаях снижение приспособленности патогена может проявляться в виде других недостатков приспособленности, таких как пониженная переносимость определенных факторов окружающей среды (например, переносимость высокой или низкой температуры), пониженная способность к выживанию в определенных средах обитания или пониженная способность к поддержанию определенного режима питания по сравнению с патогеном, которому не доставляли композицию для контроля патогенов. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения приспособленности патогена множеством путей, описанных в данном документе. Дополнительно, композиция для контроля патогенов может снижать приспособленность патогена в любом количестве классов, порядков, семейств, родов или видов патогенов (например, 1 вида патогена, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, или больше видов патогенов). В некоторых случаях композиция для контроля патогенов действует на один класс, отряд, семейство, род или вид вредителей.

Приспособленность патогена можно оценивать с помощью любых стандартных способов в данной области. В некоторых случаях приспособленность вредителя можно оценивать посредством оценки отдельного патогена. В качестве альтернативы, приспособленность вредителя можно оценивать посредством оценки популяции патогена. Например, снижение приспособленности патогена может проявляться в виде снижения степени успешного конкурирования по сравнению с другими патогенами, что приводит тем самым к уменьшению размера популяции патогена.

В. Доставка по отношению к переносчику патогена

В данном документе предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к переносчику патогена, например, раскрытому в данном

документе, путем приведения патогена в контакт с композицией для контроля патогенов. Способы могут являться полезными для снижения приспособленности переносчика патогена, например, для контроля распространения патогена в результате доставки композиции для контроля патогенов. Примеры переносчиков патогенов, на которых можно воздействовать в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают насекомых, таких как описанные в разделе IV.G.

Например, в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности переносчика патогена животных, при этом способ включает доставку по отношению к переносчику эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком. В некоторых случаях способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где переносчик растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение. В некоторых случаях композицию доставляют в виде пригодной для питания композиции для поглощения переносчиком. В некоторых случаях переносчик представляет собой насекомое. В некоторых случаях насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь. В некоторых случаях композицию доставляют (например, переносчику патогена) в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

Например, в данном документе предусмотрен способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, включающей в себя совокупность РМР, где совокупность РМР включает в себя инсектицидное средство. Например, насекомым-переносчиком может являться комар, клещ, микроскопический клещ или вошь. В данном документе предусмотрены другие неограничивающие примеры переносчиков патогенов. В некоторых случаях способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.

В некоторых случаях снижение приспособленности переносчика может проявляться в виде ухудшения или снижения физиологических функций переносчика (например, ухудшения состояния организма или выживаемости) в результате введения композиции. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена с помощью одного или нескольких параметров, включая без ограничения скорость размножения, продолжительность жизни, подвижность, плодовитость, вес тела, скорость или активность метаболизма или выживаемость по сравнению с организмом-переносчиком, которому композиция не была доставлена. Например, способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения общего состояния переносчика или для снижения общей выживаемости переносчика. В некоторых случаях снижение выживаемости переносчика составляет

приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у переносчика, который не получает композицию). В некоторых случаях способы и композиции являются эффективными для снижения интенсивности размножения переносчика (например, скорости размножения) по сравнению с организм-переносчиком, которому композиция не была доставлена. В некоторых случаях способы и композиции эффективны для снижения других физиологических параметров, таких как подвижность, вес тела, продолжительность жизни, репродуктивная способность или скорость метаболизма, на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у переносчика, которому не доставляют композицию).

В некоторых случаях снижение приспособленности переносчика может проявляться в виде повышения восприимчивости переносчика к пестицидному средству и/или снижения устойчивости переносчика к пестицидному средству по сравнению с организм-переносчиком, которому композиция не была доставлена. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для повышения восприимчивости переносчика к пестицидному средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у переносчика, который не получает композицию). Пестицидное средство может представлять собой любое пестицидное средство, известное в данной области техники, в том числе инсектицидные средства. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут повышать восприимчивость переносчика к пестицидному средству посредством снижения способности переносчика метаболизировать пестицидное средство или расщеплять его на пригодные к использованию субстраты по сравнению с переносчиком, которому композиция не была доставлена.

В некоторых случаях снижение приспособленности переносчика может проявляться в виде других недостатков приспособленности, таких как снижение переносимости определенных факторов окружающей среды (например, переносимости высокой или низкой температуры), снижение способности к выживанию в определенных средах обитания или снижение способности к поддержанию определенного режима питания по сравнению с организм-переносчиком, которому композиция не была доставлена. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения приспособленности переносчика с помощью любого из многих путей, описанных в данном документе. Дополнительно, композиция может снижать приспособленность переносчиков в любом количестве классов, порядков, семейств, родов или видов переносчиков (например, 1 вида переносчика, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 200, 250, 500 или больше видов переносчиков). В некоторых случаях композиция действует на один

класс, отряд, семейство, род или вид переносчика.

Приспособленность переносчика можно оценивать с помощью любых стандартных способов в данной области. В некоторых случаях приспособленность переносчика можно оценивать посредством оценки отдельного переносчика. В качестве альтернативы приспособленность переносчика можно оценивать посредством оценки популяции переносчиков. Например, снижение приспособленности переносчика может проявляться в виде снижения степени успешного конкурирования по сравнению с другими переносчиками, что приводит тем самым к уменьшению размера популяции переносчика.

Благодаря снижению приспособленности переносчиков, которые несут патогены животных, предусмотренные в данном документе композиции являются эффективными для снижения распространения заболеваний, передаваемых переносчиками. Композицию можно доставлять насекомым с помощью любого из составов и способов доставки, описанных в данном документе, в количестве и в течение периода времени, эффективных для снижения передачи заболевания, например, снижения вертикальной или горизонтальной передачи между переносчиками и/или снижения передачи животным. Например, композиция, описанная в данном документе, может снижать вертикальную или горизонтальную передачу патогена, передаваемого переносчиком, на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с организмом-переносчиком, которому композиция не была доставлена. В качестве другого примера, композиция, описанная в данном документе, может снижать векторную компетентность насекомого, являющегося переносчиком, на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с организмом-переносчиком, которому композиция не была доставлена.

Неограничивающие примеры заболеваний, которые можно контролировать с помощью композиций и способов, предусмотренных в данном документе, включают заболевания, вызываемые вирусами *Togaviridae* (например, чикунгунья, лихорадку реки Росс, лихорадку Майаро, лихорадку Онионг-Нионг, лихорадку Синдбис, восточный лошадиный энцефаломиелит, западный лошадиный энцефаломиелит, венесуэльский лошадиный энцефаломиелит или лихорадку леса Барма); заболевания, вызываемые вирусами *Flaviviridae* (например, лихорадку Денге, желтую лихорадку, болезнь Кьясанурского леса, омскую геморрагическую лихорадку, японский энцефалит, энцефалит долины Муррея, энцефалит Росио, энцефалит Сент-Луис, энцефалит Западного Нила или клещевой энцефалит); заболевания, вызываемые вирусами *Bunyaviridae* (например, москитную лихорадку, лихорадку долины Рифт, энцефалит, вызываемый вирусом Ла Кросс, калифорнийский энцефалит, геморрагическую лихорадку Крым-Конго или лихорадку Оропуч); заболевания, вызываемые вирусами *Rhabdoviridae* (например, везикулярный стоматит); заболевания, вызываемые вирусами *Orbiviridae* (например, блутанг); заболевания, вызываемые бактериями (например, чуму, туляремию, Ку-лихорадку, пятнистую лихорадку Скалистых гор, мышинный тиф, марсельскую лихорадку, клещевой тиф Квинсленда, сибирский клещевой тиф, цуцугамуши, возвратную лихорадку

или болезнь Лайма); или заболевания, вызываемые простейшими (например, малярию, африканский трипаносомоз, нагану, болезнь Шагаса, лейшманиоз, пироплазмоз, филяриоз Банкрофта или бругиоз).

С. Способы применения

Патоген или переносчик патогена, описанные в данном документе, могут подвергаться воздействию любой из композиций, описанных в данном документе, любым подходящим способом, который обеспечивает доставку или введение композиции по отношению к патогену или переносчику патогена. Композицию для контроля патогенов можно доставлять либо отдельно, либо в комбинации с другими активными (например, пестицидными средствами) или неактивными веществами и можно наносить, например, посредством распыления, микроинъекции, через растения, посредством полива, погружения, в форме концентрированных жидкостей, гелей, растворов, суспензий, спреев, порошков, пеллет, брикетов, плиток и т. п., составленных для доставки эффективной концентрации композиции для контроля патогенов. Количества и места нанесения описанных в данном документе композиций обычно определяются условиями обитания патогена или переносчика патогенов, стадией жизненного цикла, на которой на патоген или переносчика патогенов можно целенаправленно воздействовать с помощью композиции для контроля патогенов, участком, в котором нанесение должно осуществляться, а также физическими и функциональными характеристиками композиции для контроля патогенов. Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, можно вводить патогену или переносчику патогенов путем перорального приема, однако также можно вводить с помощью средств, которые обеспечивают проникновение через кутикулу или проникновение в дыхательную систему патогена или переносчика патогенов.

В некоторых случаях патоген или переносчика патогенов можно просто "намочить" или "опрыскать" раствором, содержащим композицию для контроля патогенов. В качестве альтернативы композицию для контроля патогенов можно связать с пищевым компонентом (например, пригодным для питания) для патогена или переносчика патогенов для облегчения доставки и/или в целях повышения поглощения композиции для контроля патогенов вредителем. Способы перорального введения включают, например, непосредственное смешивание композиции для контроля патогенов с пищей патогена или переносчика патогенов, распыление композиции для контроля патогенов в среде обитания патогена или переносчика патогенов или на поле, а также подходы на основе конструирования, в которых вид, который используется в качестве пищи, конструируется с целью экспрессии композиции для контроля патогенов, после чего скармливается патогену или переносчику патогенов, подлежащему отрицательному воздействию. В некоторых случаях, например, композицию для контроля патогенов можно включать в состав пищи патогена или переносчика патогена или покрывать ее сверху. Например, композицию для контроля патогенов можно распылять на поле с сельскохозяйственными культурами, на которых обитает патоген или переносчик

патогенов.

В некоторых случаях композицию распыляют непосредственно на растение, например сельскохозяйственные культуры, например, с помощью ранцевого опрыскивания, опрыскивания с воздуха, опрыскивания/опыливания сельскохозяйственных культур и т. д. В случаях когда композицию для контроля патогенов доставляют в растение, - растение, получающее композицию для контроля патогенов, может находиться на любой стадии роста растения. Например, составленные композиции для контроля патогенов можно наносить в виде покрытия для семян или корневой обработки на ранних стадиях роста растения или в виде общей обработки растения на более поздних стадиях цикла урожая. В некоторых случаях композицию для контроля патогенов можно применять в отношении растения в качестве местного средства, так чтобы патоген или переносчик патогенов заглатывал или иным образом приходил в контакт с растением при взаимодействии с растением.

Дополнительно, композицию для контроля патогенов можно применять (например, в отношении почвы, в которой растение растет, или в отношении воды, которую используют для полива растения) в качестве системного средства, которое поглощается и распределяется по тканям растения или патогена или переносчика патогенов животного, таким образом, что патоген или переносчик патогенов, питающийся на нем, будет получать эффективную дозу композиции для контроля патогенов. В некоторых случаях растения или организмы, используемые в качестве пищи, могут быть генетически трансформированы для экспрессии композиции для контроля патогенов так, чтобы патоген или переносчик патогенов, питающийся на растении или организме, используемом в качестве пищи, будет заглатывать композицию для контроля патогенов.

Замедленное или непрерывное высвобождение также может достигаться посредством покрытия композиции для контроля патогенов или композиции с композицией(-ями) для контроля патогенов растворимым или биоразрушаемым слоем покрытия, таким как желатин, при этом данное покрытие растворяется или разрушается в среде применения, что затем делает композицию для контроля патогенов доступной, или посредством диспергирования средства в растворимой или разрушаемой матрице. Такое непрерывное высвобождение и/или распределение означает, что устройства могут предпочтительно использоваться для устойчивого поддержания эффективной концентрации одной или нескольких композиций для контроля патогенов, описанных в данном документе, в конкретной среде обитания патогена или переносчика патогенов.

Композицию для контроля патогенов также можно включать в среду, в которой патоген или переносчик патогенов растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение. Например, композицию для контроля патогенов можно включать в контейнер для пищи, кормушку, защитную обертку или улей. В некоторых путях применения композицию для контроля патогенов можно связывать с твердой подложкой для применения в порошкообразной форме или состоянии "ловушки" или "кормушки". В качестве примера, в путях применения, в которых композиция подлежит

применению в ловушке или в виде приманки для определенного патогена или переносчика патогенов, композиции также можно связывать с твердой подложкой или инкапсулировать в материал с медленным высвобождением. Например, композиции, описанные в данном документе, можно вводить посредством доставки композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где сельскохозяйственный патоген или переносчик патогенов растет, живет, размножается или питается.

Пестициды часто рекомендуются для полевого применения в виде количества пестицида на гектар (г/га или кг/га) или количества активного ингредиента или кислотного эквивалента на гектар (кг а.и./га или г а.и./га). В некоторых случаях может потребоваться меньшее количество пестицида в композициях по настоящему изобретению для нанесения на почву, среду для растения, семена, ткань растений или растения для достижения тех же результатов, что и в случае применения пестицида в композиции, не содержащей РМР. Например, количество пестицидного средства может применяться на уровнях в приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 или 100 раз меньше (или в любом диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 100 раз, например, приблизительно 2-10 раз; приблизительно 5-15 раз, приблизительно 10-20 раз; приблизительно 10-50 раз), чем то же пестицидное средство, применяемое в композиции, не содержащей РМР, например, при непосредственном нанесении того же пестицидного средства. Композиции для контроля патогенов, раскрытые в данном документе, могут применяться в различных количествах на гектар, например, приблизительно 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 1, 2, 10, 100, 1 000, 2000, 5000 (или любой диапазон от приблизительно 0,0001 до 5000) кг/га. Например, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,01, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000 кг/га.

IV. Патогены или их переносчики

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы, описанные в данном документе, пригодны для снижения приспособленности патогена животных и, таким образом, лечения или предупреждения инфекций у животных. В данном документе дополнительно описаны примеры патогенов животных или их переносчиков, которые можно обрабатывать композициями по настоящему изобретению или с помощью соответствующих способов по настоящему изобретению.

A. Грибы

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть пригодны для снижения приспособленности гриба, например, для предупреждения или лечения грибковой инфекции у животного. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к грибу путем обеспечения контакта гриба с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение грибковой инфекции (например, вызванной грибом, описанным в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля

патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для лечения или предупреждения грибковых инфекций у животных, включая инфекции, вызванные грибами, принадлежащими к Ascomycota (*Fusarium oxysporum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus* spp., *Coccidioides immitis/posadasii*, *Candida albicans*), Basidiomycota (*Filobasidiella neoformans*, *Trichosporon*), Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*, *Enterocytozoon bieneusi*), Mucoromycotina (*Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*).

В некоторых случаях грибковая инфекция является инфекцией, вызываемой грибом, принадлежащим к типу Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Microsporidia или Zygomycota. Грибковая инфекция или чрезмерный рост может включать один или несколько видов грибов, например, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. auris*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia globosa*, *M. restricta*, или *Debaryomyces hansenii*, *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicicola*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *P. jirovecii*, *P. murina*, *P. oryctolagi*, *P. wakefieldiae*, и *Aspergillus clavatus*. Вид гриба может считаться патогеном или условно-патогенным микроорганизмом.

В некоторых случаях грибковая инфекция вызывается грибом из рода *Candida* (т. е. инфекция *Candida*). Например, инфекция *Candida* может быть вызвана грибом из рода *Candida*, который выбран из группы, состоящей из инфекций *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. auris*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, и *C. lusitaniae*. *Candida*, которые можно лечить с помощью способов, раскрытых в данном документе, включая без ограничения кандидемия, ротоглоточный кандидоз, кандидоз пищевода, кандидоз слизистых оболочек, генитальный кандидоз, вульвовагинальный кандидоз, кандидоз прямой кишки, кандидоз печени, кандидоз почек, кандидоз легких, кандидоз селезенки, отомироз, остеомиелит, септический артрит, сердечно-сосудистый кандидоз (например, эндокардит) и инвазивный кандидоз.

В. Бактерии

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть пригодны для снижения приспособленности бактерии, например, для предупреждения или лечения бактериальной инфекции у животного. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов бактерии путем приведения в контакт бактерии с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение бактериальной инфекции (например, вызванной бактерией, описанной в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения бактериальной инфекции у животных, вызываемой любыми

бактериями, дополнительно описанными ниже. Например, бактерии могут принадлежать к Bacillales (*B. anthracis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*), Lactobacillales (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*), Clostridiales (*C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*), Spirochaetales (*Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*), Chlamydiales (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*), Actinomycetales (*C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*), Rickettsiales (*R. prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. typhi*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*), Rhizobiales (*Brucella melitensis*), Burkholderiales (*Bordetella pertussis*, *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*), Neisseriales (*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*), Campylobacterales (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*), Legionellales (*Legionella pneumophila*), Pseudomonadales (*A. baumannii*, *Moraxella catarrhalis*, *P. aeruginosa*), Aeromonadales (*Aeromonas* sp.), Vibrionales (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*), Thiotrichales, Pasteurellales (*Haemophilus influenzae*), Enterobacteriales (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *E. coli*).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Pseudomonas aeruginosa* или *Escherichia coli*.

С. Паразитические насекомые

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть пригодны для снижения приспособленности паразитического насекомого, например, для предупреждения или лечения инфицирования животных паразитическими насекомыми. Термин "насекомое" включает любой организм, принадлежащий к типу Arthropoda и к классу Insecta или классу Arachnida, на любой стадии развития, т. е. неполовозрелых и взрослых насекомых. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к насекомому путем обеспечения контакта насекомого с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение инфицирования паразитическими насекомыми (например, вызванного паразитическим насекомым, описанным в данном документе) животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения инфицирования животных посредством паразитического насекомого, включая инфекции посредством насекомых, принадлежащих к Phthiraptera: *Anoplura* (сосущие вши), *Ischnocera* (власоеды), *Amblycera* (пухоеды). *Siphonaptera*: *Pulicidae* (блохи кошачьи), *Ceratophyllidae* (блохи куриные). *Diptera*: *Culicidae* (комары), *Ceratopogonidae* (мокрецы), *Psychodidae* (бабочницы), *Simuliidae* (мошки), *Tabanidae* (слепни), *Muscidae* (комнатные мухи и т.д.), *Calliphoridae* (мясные мухи), *Glossinidae* (мухи цеце), *Oestridae* (носоглоточные оводы), *Hippoboscidae* (кровососки). *Hemiptera*: *Reduviidae* (хищнецы), *Cimicidae* (клопы постельные). *Arachnida*: *Sarcoptidae* (чесоточные клещи), *Psoroptidae* (клещи-накожные), *Cytoditidae* (клещи воздушных мешков птиц), *Laminosioptes* (цистовые клещи птиц), *Analgidae* (перьевые клещи), *Acaridae* (зерновые

клещи), *Demodicidae* (клещи-железницы), *Cheyletiellidae* (клещи-пухоеды), *Trombiculidae* (краснотелковые клещи), *Dermanyssidae* (клещи птшиц), *Macronyssidae* (клещи птшиц), *Argasidae* (аргасовые клещи), *Ixodidae* (иксодовые клещи).

Д. Простейшие

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть пригодны для снижения приспособленности паразитических простейших, например, для предупреждения или лечения инфицирования животных паразитическими простейшими. Термин "простейшие" включает любой организм, принадлежащий к типу Protozoa. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к паразитическому простейшему путем обеспечения контакта паразитического простейшего с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение протозойной инфекции (например, вызванной простейшими, описанными в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения инфицирования животных паразитическими простейшими, в том числе простейшими, принадлежащих к Euglenozoa (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* spp.), Heterolobosea (*Naegleria fowleri*), Diplomonadida (*Giardia intestinalis*), Amoebozoa (*Acanthamoeba castellanii*, *Balamuthia mandrillaris*, *Entamoeba histolytica*), Blastocystis (*Blastocystis hominis*), Apicomplexa (*Babesia microti*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*).

Е. Нематоды

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть полезны для снижения приспособленности паразитических нематод, например, для предупреждения или лечения инфицирования паразитическими нематодами у животного. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к паразитической нематодой путем обеспечения контакта паразитической нематоды с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение инфицирования паразитическими нематодами (например, вызванного паразитической нематодой, описанной в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения инфицирования животных паразитическими нематодами, включая нематоды, принадлежащих к *Nematoda* (круглые черви): *Angiostrongylus cantonensis* (легочная нематода крыс), *Ascaris lumbricoides* (человеческая аскарида), *Baylisascaris procyonis* (аскарида енота), *Trichuris trichiura* (власоглав), *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus* (анкилостомы человека), *Cestoda* (ленточные черви): *Echinococcus*

granulosus, Echinococcus multilocularis, Taenia solium (свиной цепень).

F. Вирусы

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы могут быть пригодны для снижения приспособленности вируса, например, для предупреждения или лечения вирусной инфекции у животного. Предусмотрены способы доставки композиции для контроля патогенов по отношению к вирусу путем обеспечения контакта вируса с композицией для контроля патогенов. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение вирусной инфекции (например, вызванной вирусом, описанным в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в этом, путем введения животному композиции для контроля патогенов.

Композиции для контроля патогенов и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения вирусной инфекции у животных, включая инфекции, вызываемые вирусами, принадлежащими к ДНК-вирусам: *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Herpesviridae*; одноцепочечным РНК-вирусам с отрицательной цепью: *Arenaviridae*, *Paramyxoviridae* (*Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Pneumovirus*, *Morbillivirus*), *Filoviridae* (*Marburgvirus*, *Ebolavirus*), *Bornaoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Nairovirus*, *Hantaviruses*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*. Одноцепочечным РНК-вирусам с положительной цепью: *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae* (*Rubivirus*, *Alphavirus*), *Flaviviridae* (*Hepacivirus*, *Flavivirus*), *Picornaviridae* (*Hepatovirus*, *Rhinovirus*, *Enterovirus*); или вирусам с dsRNA и ретроинтегрируемым вирусам: *Reoviridae* (*Rotavirus*, *Coltivirus*, *Seadornavirus*), *Retroviridae* (*Deltaretrovirus*, *Lentivirus*), *Hepadnaviridae* (*Orthohepadnavirus*).

G. Переносчики патогенов

Способы и композиции, предусматриваемые в данном документе, могут быть пригодны для снижения приспособленности переносчика патогена животного. В некоторых случаях переносчиком может являться насекомое. Например, насекомые-переносчики могут включать без ограничения насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом, как обнаруженные у насекомых отряда Hemiptera и некоторых из отрядов Hymenoptera и Diptera, таких как комары, пчелы, осы, мокрецы, вши, муха цеце, блохи и муравьи, а также представителей класса Arachnida, таких как клещи и микроскопические клещи; отряда, класса или семейства Acarina (клещей и микроскопических клещей), например, представителей семейств Argasidae, Dermanyssidae, Ixodidae, Psoroptidae или Sarcoptidae и представителей видов *Amblyomma* spp., *Anocenton* spp., *Argas* spp., *Boophilus* spp., *Cheyletiella* spp., *Chorioptes* spp., *Demodex* spp., *Dermacentor* spp., *Denmanyssus* spp., *Haemophysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp., *Lynxacarus* spp., *Mesostigmata* spp., *Notoednes* spp., *Ornithodoros* spp., *Ornithonyssus* spp., *Otobius* spp., *otodectes* spp., *Pneumonyssus* spp., *Psoroptes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Sarcoptes* spp., или *Trombicula* spp.; Anoplura (сосущие и кусающие вши), например, представителей видов *Bovicola* spp., *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Menopon* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp.,

Phylloxera spp., или Solenopotes spp.; Diptera (мухи), например, представителей видов Aedes spp., Anopheles spp., Calliphora spp., Chrysomyia spp., Chrysops spp., Cochliomyia spp., Cw/ex spp., Culicoides spp., Cuterebra spp., Dermatobia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Haematobia spp., Haematopota spp., Hippobosca spp., Hypoderma spp., Lucilia spp., Lyperosia spp., Melophagus spp., Oestrus spp., Phaenicia spp., Phlebotomus spp., Phormia spp., Acari (зудня чесоточного), например, Sarcoptidae spp., Sarcophaga spp., Simulium spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tannia spp. или Zzpu/alpha spp.; Mallophaga (пухоеды), например, представителей видов Damalina spp., Felicola spp., Heterodoxus spp. или Trichodectes spp.; или Siphonaptera (бескрылых насекомых), например, представителей видов Ceratophyllus spp., Xenopsylla spp.; Cimicidae (клопы настоящие полужесткокрылые), например, представителей видов Cimex spp., Tritominae spp., Rhodnius spp. или Triatoma spp.

В некоторых случаях насекомое представляет собой кровососущее насекомое из отряда Diptera (например, подотряда Nematocera, например семейства Culicidae). В некоторых случаях насекомое относится к подсемействам Culicinae, Corethrinae, Ceratopogonidae или Simuliidae. В некоторых случаях насекомое относится к Culex spp., Theobaldia spp., Aedes spp., Anopheles spp., Aedes spp., Forcipomyia spp., Culicoides spp. или Helea spp.

В определенных случаях насекомое представляет собой комара. В определенных случаях насекомое представляет собой иксодового клеща. В определенных случаях насекомое представляет собой микроскопического клеща. В определенных случаях насекомое представляет собой пухоеда.

V. Гетерологичные функциональные средства

Композиции для контроля патогенов, описанных в данном документе, могут дополнительно содержать дополнительное средство, такое как гетерологичное функциональное средство (например, противогрибковое средство, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство). В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство (например, противогрибковое средство, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство) включено в РМР. Например, РМР может инкапсулировать гетерологичное функциональное средство (например, противогрибковое средство, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство). В качестве альтернативы гетерологичное функциональное средство (например, противогрибковое средство, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство) может быть встроено в поверхность или конъюгировано с поверхностью РМР. В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает

два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных гетерологичных функциональных средств.

В других случаях композиция для контроля патогенов может быть составлена с включением гетерологичного функционального средства (например, противогрибкового средства, противобактериального средства, вируцидного средства, противовирусного средства, инсектицидного средства, нематоцидного средства, противопаразитарного средства или репеллентного средства), необязательно ассоциированного с РМР. В составах и в формах для применения, полученных из этих составов, композиция для контроля вредителей может включать дополнительные активные соединения, такие как антибактериальные средства, инсектициды, стерилизаторы, акарициды, нематоциды, моллюскоциды, бактерициды, фунгициды, вируциды, аттрактанты или репелленты.

Пестицидное средство может включать средство, пригодное для доставки по отношению к переносчику патогена животного, например, пестицидное средство, такое как противогрибковое средство, противобактериальное средство, инсектицидное средство, моллюскоцидное средство, нематоцидное средство, вируцидное средство или их комбинации. Пестицидное средство может представлять собой химическое средство, например хорошо известное из уровня техники. Пестицидное средство может представлять собой средство, которое может снижать приспособленность различных патогенов животных или их переносчиков, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одного или нескольких конкретных патогенов животных или их переносчиков (например, конкретный вид или род патогенов или их переносчиков).

В качестве альтернативы или дополнительно гетерологичное функциональное средство (например, противогрибковое средство, противобактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство) может являться пептидом, полипептидом, нуклеиновой кислотой, полинуклеотидом или низкомолекулярным соединением. В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство может быть модифицировано. К примеру, модификация может представлять собой химическую модификацию, например конъюгацию с маркером, например флуоресцентным маркером или радиоактивным маркером. В других случаях модификация может включать в себя конъюгацию или функциональную связь с фрагментом, что обеспечивает повышение в отношении стабильности, доставки, целенаправленного воздействия, биологической доступности или периода полужизни средства, например липида, гликана, полимера (например, PEG), катионного фрагмента.

Ниже приведены примеры дополнительных гетерологичных функциональных средств (например, противогрибкового средства, противобактериального средства, вируцидного средства, противовирусного средства, инсектицидного средства, нематоцидного средства, противопаразитарного средства или репеллентного средства), которые можно применять в композициях для контроля патогенов и способах, раскрытых

в настоящем изобретении.

А. Противобактериальные средства

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать противобактериальное средство. Например, описанную в данном документе композицию для контроля патогенов, включающую антибиотик, можно вводить животному в количестве и в течение времени, достаточных для: достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) концентрации антибиотика внутри или на поверхности организма животного; и/или лечения или предупреждения бактериальной инфекции у животного. Противобактериальные средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции для контроля патогенов включают два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных противобактериальных средств.

Используемый в данном документе термин "противобактериальное средство" относится к материалу, который уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение бактерий, таких как фитопатогенные бактерии, и включает бактерицидные (например, дезинфицирующие соединения, антисептические соединения или антибиотики) или бактериостатические средства (например, соединения или антибиотики). Бактерицидные антибиотики уничтожают бактерии, в то время как бактериостатические антибиотики лишь замедляют их рост или размножение.

Бактерициды могут включать дезинфицирующие средства, антисептики или антибиотики. Наиболее часто используемые дезинфицирующие средства могут предусматривать: активный хлор (например, гипохлориты (например, гипохлорит натрия), хлорамины, дихлоризоцианурат и трихлоризоцианурат, влажный хлор, диоксид хлора и т. д.), активный кислород (пероксиды, такие как перуксусная кислота, персульфат калия, перборат натрия, перкарбонат натрия и пергидрат мочевины), йод (йодповидон (повидон-йод, бетрадин), раствор Люголя, настойка йода, йодированные неионные поверхностно-активные вещества), концентрированные спирты (в основном этанол, 1-пропанол, также называемый н-пропанолом и 2-пропанолом, называемый изопропанолом и их смеси; кроме того, используются 2-феноксэтанол и 1- и 2-феноксипропанола), фенольные вещества (такие как фенол (также называемый карболовой кислотой), крезолы (называемые лизолом в сочетании с жидкими калиевыми мылами), галогенированные (хлорированные, бромированные) фенолы, такие как гексахлорфен, триклозан, трихлорфенол, трибромфенол, пентахлорфенол, дибромол и их соли), катионные поверхностно-активные вещества, такие как некоторые четвертичные аммониевые катионы (такие как хлорид бензалкония, бромид или хлорид цетилтриметиламмония, хлорид дидецилдиметиламмония, хлорид цетилпиридиния, хлорид бензетония) и другие, не четвертичные соединения, такие как хлоргексидин, глюкопротамин, дигидрохлорид октенидина и т. д.), сильные окислители, такие как озон и перманганатные растворы;

тяжелые металлы и их соли, такие как коллоидное серебро, нитрат серебра, хлорид ртути, соли фенилртути, сульфат меди, оксид-хлорид меди, гидроксид меди, октаноат меди, сульфат оксихлорида меди, сульфат меди, пентагидрат сульфата меди и др. Тяжелые металлы и их соли являются наиболее токсичными и опасными для окружающей среды бактерицидами, поэтому их использование строго ограничено или отменено; кроме того, также это относится к должным образом концентрированным сильным кислотам (фосфорная, азотная, серная, амидосерная, толуолсульфоновая кислоты) и щелочам (гидроксиды натрия, калия, кальция).

В качестве антисептиков (т. е. гермицидных средств, которые можно использовать на теле, коже, слизистых оболочках, ранах и т. п. человека или животных) можно использовать некоторые из вышеупомянутых дезинфицирующих средств при надлежащих условиях (главным образом концентрации, рН, температуре и токсичности по отношению к человеку/животному). Среди них важными являются: должным образом разбавленные препараты хлора (т. е. раствор Дакина, 0,5% раствор гипохлорита натрия или калия, с доведением рН до рН 7-8, или 0,5-1% раствор бензолсульфохлорамида натрия (хлорамин В)), некоторые препараты йода, такие как йодоповидон в различных галенах (мази, растворы, пластыри для ран), в прошлом также раствор Люголя, пероксиды в виде растворов пергидрата мочевины и 0,1-0,25% рН-буференные растворы надуксусной кислоты, спирты с антисептическими добавками или без них, используемые в основном в качестве кожного антисептика, слабые органические кислоты, такие как сорбиновая кислота, бензойная кислота, молочная кислота и салициловая кислота, некоторые фенольные соединения, такие как гексахлорфен, триклозан и дибромол, и катионно-активные соединения, такие как 0,05-0,5% бензалконий, 0,5-4% хлоргексидин, 0,1-2% растворы октенидина.

Композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, может включать антибиотик. Можно применять любой антибиотик, известный в уровне техники. Антибиотики обычно классифицируются на основании их механизма действия, химической структуры или спектра активности.

Антибиотик, описанный в данном документе, может целенаправленно воздействовать на любую функцию или процессы роста бактерий и может быть как бактериостатическим (например, замедлять или предупреждать рост бактерий), так и бактерицидным (например, уничтожать бактерии). В некоторых случаях антибиотик представляет собой бактерицидный антибиотик. В некоторых случаях бактерицидный антибиотик представляет собой антибиотик, который целенаправленно воздействует на клеточную стенку бактерий (например, пенициллины и цефалоспорины); антибиотик, который целенаправленно воздействует на клеточную мембрану (например, полимиксины); или антибиотик, который ингибирует важнейшие ферменты бактерий (например, рифамицины, липиармицины, хинолоны и сульфонамиды). В некоторых случаях бактерицидный антибиотик представляет собой аминогликозид (например, касугамицин). В некоторых случаях антибиотик представляет собой бактериостатический

антибиотик. В некоторых случаях бактериостатический антибиотик целенаправленно воздействует на синтез белка (например, макролиды, линкозамиды и тетрациклины). Дополнительные классы антибиотиков, которые можно применять в данном документе, включают циклические липопептиды (такие как даптомицин), глицилциклины (такие как тигециклин), оксазолидиноны (такие как линезолид) или липиармицины (такие как фидаксомицин). Примеры антибиотиков включают рифампицин, ципрофлоксацин, доксициклин, ампициллин и полимиксин В. Антибиотик, описанный в данном документе, может иметь любой уровень целевой специфичности (например, узкий или широкий спектр). В некоторых случаях антибиотик представляет собой антибиотик узкого спектра действия и, таким образом, целенаправленно воздействует на конкретные типы бактерий, такие как грамотрицательные или грамположительные бактерии. В качестве альтернативы, антибиотик может представлять собой антибиотик широкого спектра действия, который целенаправленно воздействует на широкий круг бактерий. В некоторых случаях антибиотик представляет собой доксорубицин или ванкомицин.

Примеры противобактериальных средств, пригодных для лечения животных, включают пенициллины (амоксициллин, ампициллин, бакампициллин, карбенициллин, клоксациллин, диклоксациллин, флуклоксациллин, мезлоциллин, нафциллин, оксациллин, пенициллин G, кристициллин 300 A.S., пентидс, пермапен, пфизерпен, пфизерпен-AS, вициллин, пенициллин V, пиперациллин, пивампициллин, пивмециллинам, тикарциллин), цефалоспорины (цефаксетрил (cephacetile), цефадроксил (cefadroxyl), цефалексин (cephalexin), цефалоглицин (cephaloglycin), цефалоний (cephalonium), цефалоридин (cephaloridine), цефалотин (cephalothin), цефапирин (cephapirin), цефатризин, цефазафлур, цефазедон, цефазолин (cephazolin), цефрадин (cephradine), цефроксадин, цефтезол, цефаклор, цефамандол, цефметазол, цефоницид, цефотетан, цефокситин, цефпрозил (cefprozil), цефуроксим, цефузонам, цефкапен, цефдалоксим, цефдинир, цефдиторен, цефетамет, цефиксим, цефменоксим, цефодизим, цефотаксим, цефпимизол, цефподоксим, цефтерам, цефтибутен, цефтиофур, цефтиолен, цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим, цефклидин, цефепим, цефлупренам, цефоселис, цефозопран, цефпиром, цефквином, цефтобипрол, цефтаролин, цефакломезин, цефалорам, цефапарол, цефканель, цефедролор, цефемпидон, цефетризол, цефивитрил, цефматилен, цефмепидиум, цефовецин, цефоксазол, цефротил, цефсумид, цефурацетим, цефтиоксид, комбинации, цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам), монобактамы (азтреонам), карбапенемы (имипенем, имипенем/циластатин, дорипенем, эртапенем, меропенем, меропенем/ваборбактам), макролиды (азитромицин, эритромицин, кларитромицин, диритромицин, рокситромицин, телитромицин), линкозамиды (клиндамицин, линкомицин), стрептограммины (пристинамицин, хинупристин/далфопристин), аминогликозиды (амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, паромомицин, стрептомицин, тобрамицин), хинолон (флумекин, налидиксовая кислота, оксолиновая кислота, пиромидовая кислота, пипемидовая кислота, розоксацин, второе поколение, ципрофлоксацин, эноксацин, ломефлоксацин, надифлоксацин, норфлоксацин,

офлоксацин, пефлоксацин, руфлоксацин, балофлоксацин, гатифлоксацин, грепафлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, пазуфлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, тосуфлоксацин, безифлоксацин, делафлоксацин, клинафлоксацин, гемифлоксацин, прулифлоксацин, ситафлоксацин, тровафлоксацин), сульфонамиды (сульфаметизол, сульфаметоксазол, сульфизоксазол, триметоприм-сульфаметоксазол), тетрациклин (демеклоциклин, доксициклин, миноциклин, окситетрациклин, тетрациклин, тигециклин), другие (липopeптиды, фторхинолон, липогликопептиды, цефалоспорин, макроциклические препараты, хлорамфеникол, метронидазол, тинидазол, нитрофурантоин, гликопептиды, ванкомицин, тейкопланин, липогликопептиды, телаванцин, оксазолидиноны, линезолид, циклосерин 2, рифамицины, рифампин, рифабутин, рифапентин, рифалазил, полипептиды, бацитрацин, полимиксин В, туберактиномицины, виомицин, капреомицин).

Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого антибиотика в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность антибиотика, количество различных антибиотиков, состав и способы применения композиции.

В. Противогрибковые средства

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать противогрибковое средство. Например, композицию для контроля патогенов, включающую противогрибковое средство, описанное в данном документе, можно вводить животному в количестве и в течение времени, достаточных для достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) концентрации противогрибкового средства внутри или на поверхности организма животного; и/или лечения или предупреждения грибковой инфекции у животного. Противогрибковые средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции для контроля патогенов включают два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных противогрибковых средств.

Используемые в данном документе термины "фунгицид" или "противогрибковое средство" относятся к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение грибов, таких как грибы, патогенные для животных. Много различных типов противогрибковых средств производится на коммерческой основе. Неограничивающие примеры противогрибковых средств включают: аллиламины (аморолфин, бутенафин, нафтифин, тербинафин), имидазолы ((бифоназол, бутоконазол, клотримазол, эконазол, фентиконазол, кетоконазол, изоконазол, луликоназол, миконазол, омоконазол, оксиконазол, сертаконазол, сульконазол, тиоконазол, терконазол); триазолы (альбаконазол, эфинаконазол, флуконазол, исавуконазол, итраконазол, позаконазол, равуконазол, терконазол, вориконазол), тиазолы (абафунгин), полиены (амфотерицин В, нистатин, натамицин, трихомицин),

эхинокандины (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), другие (толнафтат, флуцитозин, бутенафин, гризеофульвин, циклопирокс, сульфид селена, таваборол). Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого противогрибкового средства в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность противогрибкового средства, количество различных противогрибковых средств, состав и способы применения композиции.

С. Инсектициды

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать инсектицид. Например, инсектицид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) насекомого, являющегося переносчиком патогена животного. Композиция для контроля патогенов, включающая описанный в данном документе инсектицид, может быть приведена в контакт с насекомым в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации инсектицида внутри насекомого или на нем; и (б) снижения приспособленности насекомого. В некоторых случаях инсектицид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) паразитического насекомого. Композиция для контроля патогенов, включающая описанный в данном документе инсектицид, может быть приведена в контакт с паразитическим насекомым или с пораженным им животным в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации инсектицида внутри паразитического насекомого или на нем; и (б) снижения приспособленности паразитического насекомого. Инсектициды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции для контроля патогенов включают два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных инсектицидных средств.

Используемые в данном документе термины "инсектицид" или "инсектицидное средство" относятся к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение насекомых, таких как насекомые-переносчики патогена животного или паразитические насекомые. Неограничивающие примеры инсектицидов приведены в таблице 1. Дополнительные неограничивающие примеры подходящих инсектицидов включают биологические препараты, гормоны или феромоны, такие как азадирахтин, виды *Bacillus*, виды *Beauveria*, кодлемон, виды *Metarrhizium*, виды *Raecilomyces*, *thuringiensis* и виды *Verticillium*, а также активные соединения с неизвестными или неуказанными механизмами действия, такие как фумиганты (такие как фосфид алюминия, бромистый метил и сульфурилфторид) и селективные ингибиторы питания (такие как криолит, флоникамид и пиметрозин). Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого инсектицида в композиции зависит

от таких факторов, как эффективность, стабильность инсектицида, количество различных инсектицидов, состав и способы применения композиции.

Таблица 1. Примеры инсектицидов

Класс	Соединения
хлорникотинилы/неоникотиноиды	ацетамиприд, клотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпирам, нитиазин, тиаклоприд, тиаметоксам, имидаклотиз, (2E)-1-[(2-хлор-1,3-тиазол-5-ил)метил]-3,5-диметил-N-нитро-1,3,5-триазинан-2-имин, ингибиторы ацетилхолинэстеразы (AChE) (такие как карбаматы и фосфорорганические соединения)
карбаматы	аланикарб, алдикарб, альдоксикарб, алликсикарб, аминокарб, бендиокарб, бенфуракарб, буфенкарб, бутакарб, бутокарбоксим, бутоксикарбоксим, карбарил, карбофуран, карбосульфат, хлэтокарб, диметилан, этиофенкарб, фенобукарб, фенотиокарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метам-натрий, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, фосфокарб, пиримикарб, промекарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметакарб, ХМС, ксиликарб
фосфорорганические соединения	ацефат, азаметифос, азинфос (-метил, -этил), бромфос-этил, бромфенвинфос (-метил), бутиофос, кадусафос, карбофенотион, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос (-метил/-этил), кумафос, цианофенфос, цианофос, деметон-S-метил, деметон-S-метилсульфон, диалифос, диазинон, дихлофентион, дихлорвос/ DDVP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, диоксабензофос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, этримфос, фамфур, фенамифос, фенитроотион, фенсульфотион, фентион, флупиразофос, фонофос, формотион, фосметилан, фостиазат, гептенофос, йодофенфос, ипробенфос, изазофос, изофенфос, изопропил-O-салицилат, изоксатион, малатион, мекарбам, метакрифос, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион (-метил/-этил), фентоат,

	фосфат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фосфокарб, фоксим, пиримифос (-метил/-этил), профенофос, пропафос, пропетамфос, протиофос, протоат, пираклофос, пиридафентион, пиридатион, хинальфос, себуфос, сульфотеп, сульфофос, тебупиримфос, темефос, тербуфос, тетрахлорвинфос, тиометон, триазофос, трихлорфон, ванидотион
пиретроиды	акринатрин, аллетрин (d-цис-транс, d-транс), циперметрин (альфа-, бета-, тета-, зета-), перметрин (цис-, транс-), бета-цифлутрин, бифентрин, биоаллетрин, биоаллетрин-S-циклопентил-изомер, биоэтанометрин, биоперметрин, биоресметрин, хловапортрин, цис-циперметрин, цис-ресметрин, цис-перметрин, клоцитрин, циклопротрин, цифлутрин, цигалотрин, цифенотрин, DDT, дельтаметрин, эмпентрин (1R-изомер), эсфенвалерат, этофенпрокс, фенфлутрин, фенпропатрин, фенпиритрин, фенвалерат, флуброцитринат, флуцитринат, флуфенпрокс, флуметрин, флувалинат, фубфенпрокс, гамма-цигалотрин, имипротрин, кадетрин, лямбда, цигалотрин, метофлутрин, фенотрин (1R-транс-изомер), праллетрин, профлутрин, протрифенбут, пиресметрин, ресметрин, RU 15525, силафлуофен, тау-флувалинат, тефлутрин, тераллетрин, тетраметрин (1R-изомер), тралоцитрин, тралометрин, трансфлутрин, ZXI 8901, пиретрины (пиретрум)
оксадиазины	индосакарб, модуляторы рецепторов ацетилхолина (такие как спинозины)
спинозины	спиносад
циклодиен	камфехлор, хлордан, эндосульфан, гамма-НСН, НСН, гептахлор
хлорорганические соединения	линдан, метоксихлор
фипролы	ацетопрол, этипрол, ванилипрол, фипронил
мектины	абамектин, авермектин, эмаектин, эмаектин-бензоат,

	феноксикарб, гидропрен, кинопрен, метопрен, ивермектин, лепимектин, эпофенонан, пирипроксифен, милбемектин, милбемицин, трипрен
диацилгидразины	хромафенозид, галофенозид, метоксифенозид, тебуфенозид
различные виды бензоилмочевины	бистрифлуорон, хлорфлуазурон, дифлубензурон, флуазурон, флуциклоксурон, флуфеноксурон, гексафлумурон, луфенурон, новалурон, новифлумурон, пенфлуорон, тефлубензурон, трифлумурон
оловоорганические соединения	азоциклотин, цигексатин, оксид фенбутатина
пирролы	хлорфенапир
динитрофенолы	бинапацирл, динобутон, динокап, DНОС
МЕТІ	феназахин, фенпироксимат, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон, ацехиноцил, флуакрипирим, микробные разрушители кишечной мембраны насекомых (такие как штаммы <i>Bacillus thuringiensis</i>), ингибиторы синтеза липидов (такие как тетроновые кислоты и тетрамовые кислоты)
тетроновые кислоты	спиродиклофен, спиромезифен, спиротетрамат
тетрамовые кислоты	цис-3-(2,5-диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1-азаспиро[4.5]дец-3-ен-4-илэтилкарбонат (условное название: угольная кислота, 3-(2,5-диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1-азаспиро[4.5]дец-3-ен-4-ила сложный этиловый эфир; рег. номер в CAS: 382608-10-8), карбоксамиды (такие как флоникамид), октопаминергические агонисты (такие как амитраз), ингибиторы АТФазы, стимулируемой магнием (такие как пропаргит), агонисты рецепторов рианодина (такие как фталамиды или ринаксапир)
фталамиды	N2-[1,1-диметил-2-(метилсульфонил)этил]-3-иод-N1-[2-метил-4-[1,2,2,2-тетрафтор-1-(трифторметил)этил]фенил]-1,2-бензолдикарбоксамид (т. е. флубендиамид; рег. № в CAS: 272451-65-7)

D. Нематоциды

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать нематоцид. В некоторых случаях композиции для контроля патогенов включают два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных нематоцидов. Например, нематоцид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) паразитической нематоды. Композиция для контроля патогенов, включающая описанный в данном документе нематоцид, может быть приведена в контакт с паразитической нематодой или с пораженным ней животным в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации нематоцида внутри целевой нематоды или на ней и (б) снижения приспособленности паразитической нематоды. Нематоциды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемые в данном документе термины "нематоцид" или "нематоцидное средство" относятся к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение нематод, таких как паразитическая нематода. Неограничивающие примеры нематоцидов приведены в таблице 2. Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого нематоцида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность нематоцида, количество различных нематоцидов, состав и способы применения композиции.

Таблица 2. Примеры нематоцидов

ФУМИГАНТЫ	D-D, 1,3-дихлорпропен, дибромид этилена, 1,2-дибром-3-хлорпропан, метилбромид, хлорпикрин, метамнатрий, дазомет, метилизотиоцианат (МИТС), тетратиокарбонат натрия, хлорпикрин
КАРБАМАТЫ	Алдикарб, альдоксикарб, карбофуран, оксамил, клеотокарб
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ	Этопрофос, фенамифос, кадусафос, фостиазат, фенсульфотион, тионазин, исазофос
БИОХИМИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ	DITERA®, CLANDOSAN®, SINCOCIN®

Е. Противопаразитарное средство

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать противопаразитарное средство. Например, противопаразитарное средство может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) паразитических простейших. Композиция для контроля патогенов, включающая описанное в данном документе противопаразитарное средство, может быть приведена в

контакт с простейшим в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации противопаразитарного средства внутри или на простейшем или инфицированном им животном; и (б) снижения приспособленности простейших. Это может быть полезно при лечении или предупреждении заражения паразитами у животных. Например, композицию для контроля патогенов, включающую описанное в данном документе противопаразитарное средство, можно вводить животному в количестве и в течение времени, достаточных для: достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) концентрации противопаразитарного средства внутри или на поверхности организма животного; и/или лечения или предупреждения инфицирования паразитами у животного (например, паразитической нематодой, паразитическим насекомым или простейшим). Противопаразитарные средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных противопаразитарных средств.

Используемые в данном документе термины "противопаразитарный" или "противопаразитарное средство" относятся к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение паразитов, таких как паразитические простейшие, паразитические нематоды или паразитические насекомые. Примеры противопаразитарных средств включают антигельминтные средства (бефений, диэтилкарбамазин, ивермектин, никлозамид, пиперазин, празиквантел, пирантел, пирвиний, бензимидазолы, альбендазол, флубендазол, мебендазол, тиабендазол, левамизол, нитазоксанид, монопантел, эмодапсид, спироиндолы), противочесоточные средства (бензилбензоат, бензилбензоат/дисульфирам, линдан, малатион, перметрин), педикулициды (пиперонилбутоксид/пиретрины, спиносад, моксидектин), противочесоточные средства (кротамитон), противочесоточные средства (никлозамид, празиквантел, альбендазол), противоамебные средства (рифампицин, амфотерицин В) или противопротозойные средства (меларсопрол, эфлорнитин, метронидазол, тинидазол, милтефозин, артемизинин). В некоторых случаях противопаразитарное средство можно использовать для лечения или профилактики инфекций у животных, относящихся к домашнему скоту, например, левамизол, фенбендазол, оксфендазол, альбендазол, моксидектин, эприномектин, дорамектин, ивермектин или хлорсулон. Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого противопаразитарного средства в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность противопаразитарного средства, число различных противопаразитарных средств, состав и способы применения композиции.

Г. Противовирусное средство

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут

дополнительно включать противовирусное средство. Композицию для контроля патогенов, включающую описанное в данном документе противовирусное средство, можно вводить животному в количестве и в течение времени, достаточных для достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) концентрации противовирусного средства внутри или на поверхности организма животного; и/или лечения или предупреждения вирусной инфекции у животного. Противовирусные средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных противовирусных средств.

Используемые в данном документе термины "противовирусное средство" или "вируцид" относятся к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение, развитие или распространение вирусов, таких как вирусные патогены, инфицирующие животных. В качестве противовирусного средства можно использовать ряд средств, включая химические или биологические средства (например, нуклеиновые кислоты, например dsRNA). Примеры применимых в данном документе противовирусных средств включают абакавир, ацикловир (ацикловир), адефовир, амантадин, ампренавир (агенераза), амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, балавир, цидофовир, комбивир, долутегравир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эдоксудин, эфавиренз, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, эколивер, фамцикловир, фомивирсен, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ингибитор слияния, ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, ингибитор интегразы, интерферон III типа, интерферон II типа, интерферон I типа, интерферон, ламивудин, лопинавир, ловирид, маравирик, мороксидин, метизазон, нельфинавир, невирапин, нексавир, нитазоксанид, аналоги нуклеозидов, норвир, осельтамивир (тамифлю), пегинтерферон альфа-2а, пенцикловир, перамивир, плеконарил, подофиллотоксин, ралтегравир, рибавирин, римантадин, ритонавир, пирамидин, саквинавир, софосбувир, ставудин, синергетический усилитель (антиретровирусный), телапревир, тенофовир, тенофовир дизопроксил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир (валтрекс), валганцикловир, викривирок, видарабин, вирамидин, зальцитабин, занамивир (реленза) или зидовудин. Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого противовирусного средства в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность противовирусного средства, количество различных противовирусных средств, состав и способы применения композиции.

G. Репелленты

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут дополнительно включать репеллент. Например, репеллент может отпугивать переносчиков патогенов животных, таких как насекомые. Репелленты, описанные в

данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10) различных репеллентов.

Например, композиция для контроля патогенов, включающая в себя описанный в данном документе репеллент, может быть приведена в контакт с насекомым-переносчиком или со средой обитания переносчика в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации репеллента; и/или (b) снижения уровней насекомых вблизи или на ближайших животных по сравнению с контролем. В качестве альтернативы, композиция для контроля патогенов, включающая в себя описанный в данном документе репеллент, может быть приведена в контакт с животным в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации репеллента и/или (b) снижения уровней насекомых вблизи животного или на нем по сравнению с необработанным животным.

Некоторые примеры хорошо известных репеллентов от насекомых включают бензил; бензилбензоат; 2,3,4,5-бис(бутил-2-ен)тетрагидрофурурол (репеллент 11 MGK); бутоксиполипропиленгликоль; N-бутилацетанид; нормальный-бутил-6,6-диметил-5,6-дигидро-1,4-пирон-2-карбоксилат (индалон); дибутиладипат; дибутилфталат; ди-нормальный-бутилсукцинат (табатрекс); N, N-диэтилметатолуамид (DEET); диметилкарбат(эндо, эндо)диметилбицикло[2.2.1]гепт-5-ен-2,3-дикарбоксилат); диметилфталат; 2-этил-2-бутил-1,3-пропандиол; 2-этил-1,3-гександиол (Rutgers 612); ди-нормальный-пропилизоцинхомеронат (репеллент 326 MGK); 2-фенилциклогексанол; п-метан-3,8-диол и нормальный-пропил-N, N-диэтилсукцинамат. Другие репелленты включают масло цитронеллы, диметилфталат, оксалат нормальный-бутилмезитилоксида и 2-этилгександиол-1,3 (см. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd Ed., Vol. 11: 724-728; and The Condensed Chemical Dictionary, 8th Ed., p 756).

В некоторых случаях репеллент представляет собой репеллент против насекомых, включая синтетические или несинтетические репелленты. Примеры синтетических репеллентов от насекомых включают метилантранилат и другие репелленты на основе антранилата, бензальдегид, DEET (N, N-диэтил-м-толуамид), диметилкарбат, диметилфталат, икаридин (например, пикаридин, Baygerel и KBR 3023), индалон (например, используемый в смеси "6-2-2" (60% диметилфталата, 20% индалона, 20% этилгександиола), IR3535 (3-[N-бутил-N-ацетил]-аминопропионовой кислоты сложный этиловый эфир), метофлутрин, перметрин, SS220 или трициклодеценилаллиловый эфир. Примеры природных репеллентов от насекомых включают листья красивоплодни (Callicarpa), кору березы, болотный мирт (Myrica Gale), масло кошачьей мяты (например, непеталактон), масло цитронеллы, эфирное масло лимонного эвкалипта (Corymbia

citriodora; например, п-ментан-3,8-диол (PMD)), масло нима, лемонграсс, масло чайного дерева, полученное из листьев *Melaleuca alternifolia*, табак или их экстракты.

Н. Биологические средства

і. Полипептиды

Композиция для контроля патогенов (например, РМР), описанная в данном документе, может содержать полипептид, например, полипептид, который является противобактериальным, противогрибковым, инсектицидным, нематоцидным, противопаразитарным или вируцидным средством. В некоторых случаях композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, содержит полипептид или его функциональные фрагменты или производное, которые целенаправленно воздействуют на биохимические пути патогена. Композицию для контроля патогенов, включающую полипептид, описанный в данном документе, можно вводить патогену, его переносчику в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации полипептида и (б) уменьшения или устранения патогена. В некоторых случаях композицию для контроля патогенов, включающую полипептид, описанный в данном документе, можно вводить животному, инфицированному или подверженному риску инфицирования патогеном, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации полипептида у животного и (б) уменьшения или устранения патогена. Полипептиды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Примеры полипептидов, которые могут быть использованы в данном документе, могут включать фермент (например, метаболическую рекомбиназу, геликазу, интегразу, РНКазу, ДНКазу или белок убиквитинирования), порообразующий белок, сигнальный лиганд, проникающий в клетку пептид, фактор транскрипции, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов (например, система CRISPR-Cas, TALEN или цинковый палец), рибопроtein, белковый аптамер или шаперон.

Полипептиды, включенные в данный документ, могут включать в себя встречающиеся в природе полипептиды или рекомбинантно получаемые варианты. В некоторых случаях полипептид может представлять собой его функциональные фрагменты или варианты (например, его ферментативно активный фрагмент или вариант). Например, полипептид может представлять собой функционально активный вариант любого из полипептидов, описанных в данном документе, характеризующийся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью полипептида, описанного в данном документе, или встречающегося в природе полипептида. В некоторых случаях

полипептид может характеризоваться по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% или более высокой) идентичностью с белком, представляющим интерес.

Полипептиды, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде композиции для любого из путей применения, описанных в данном документе. Композиции, раскрытые в данном документе, могут включать в себя любое число или тип (например, классы) полипептидов, как например по меньшей мере приблизительно любое количество из 1 полипептида, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или более полипептидов. Подходящая концентрация каждого полипептида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность полипептида, количество различных полипептидов в композиции, состав и способы применения композиции. В некоторых случаях концентрация каждого полипептида в жидкой композиции составляет от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В некоторых случаях концентрация каждого полипептида в твердой композиции составляет от приблизительно 0,1 нг/г до приблизительно 100 мг/г.

Способы получения полипептида являются стандартными в данной области техники. См., в целом, Smales & James (Eds.), *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); and Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Springer (2013).

Способы получения полипептида предусматривают экспрессию в клетках растений, хотя рекомбинантные белки также могут продуцироваться с помощью клеток насекомых, дрожжей, бактерий, клеток млекопитающих или других клеток под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые участки связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорный сайт сплайсинга, акцепторный сайт сплайсинга и последовательности терминации. Последовательности ДНК, происходящие из генома вируса SV40, к примеру, точки начала репликации, раннего промотора, энхансера, сайтов сплайсинга и сайтов полиаденилирования SV40, можно применять для обеспечения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

Различные системы культивирования клеток млекопитающих можно применять для экспрессии и изготовления средства на основе рекомбинантного полипептида. Примеры систем экспрессии млекопитающих включают клетки CHO, клетки COS, клеточные линии HeLA и ВНК. Способы культивирования клеток-хозяев для получения терапевтических средств на основе белка описаны, например, в Zhou and Kantardjiev

(Eds.), *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*, Springer (2014). Очистка белков описана в Franks, *Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization*, Humana Press (2013); и в Cutler, *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press (2010). Составление терапевтических средств на основе белка описано в Meyer (Ed.), *Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic*, Woodhead Publishing Series (2012).

В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, описанное в данном документе средство может представлять собой антитело, которое блокирует или усиливает активность и/или функцию компонента патогена. Антитело может выступать по отношению к патогену в качестве антагониста или агониста полипептида (например, фермента или клеточного рецептора). Получение и применение антител против антигена-мишени патогена известно из уровня техники. См., например, Zhiqiang An (Ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, 1st Edition, Wiley, 2009, а также Greenfield (Ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013, в отношении способов получения рекомбинантных антител, в том числе конструирования антител, применения вырожденных олигонуклеотидов, 5'-RACE, фагового дисплея и мутагенеза; тестирования и характеристики антител; фармакокинетики и фармакодинамики антител; очистки и хранения антител; и методик скрининга и мечения.

Композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, может включать в себя бактериоцин. В некоторых случаях бактериоцин продуцируется естественным образом грамположительными бактериями, такими как *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Staphylococcus* или молочнокислые бактерии (LAB, такие как *Lactococcus lactis*). В некоторых случаях бактериоцин продуцируется естественным образом грамотрицательными бактериями, такими как *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia plymithicum*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum* или *Escherichia coli*. Иллюстративные бактериоцины включают без ограничения антибиотики LAB I-IV класса (такие как лантибиотики), колицины, микроцины и пиоцины.

Композиция для контроля патогенов, описанная в данном документе, может включать в себя противомикробный пептид (AMP). Можно применять любой AMP, подходящий для подавления микроорганизма. AMP представляют собой разнообразную группу молекул, которые разделяются на подгруппы на основании их аминокислотного состава и структуры. AMP может быть получен из любого организма или продуцироваться в любом организме, который естественным образом продуцирует AMP, в том числе AMP, получаемые из растений (например, копсин), насекомых (например, мастопаран, понератоксин, цекропин, морицин, меллитин), лягушек (например, магаинин, дермасептин, ауреин) и млекопитающих (например, кателицидины, дефензины и

протегрины).

ii. Нуклеиновые кислоты

Многочисленные нуклеиновые кислоты являются пригодными в композициях и способах, описанных в данном документе. Композиции, раскрытые в данном документе, могут содержать любое число или тип (например, классы) нуклеиновых кислот (например, молекулу ДНК или молекулу РНК, например, молекулу mRNA, направляющей РНК (gRNA) или ингибирующей РНК (например, siRNA, shRNA или miRNA) или гибридную молекулу ДНК-РНК), как например по меньшей мере приблизительно 1 класс или вариант нуклеиновой кислоты, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или больше классов или вариантов нуклеиновых кислот. Подходящая концентрация каждой нуклеиновой кислоты в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность нуклеиновой кислоты, количество различных нуклеиновых кислот, состав и способы применения композиции. Примеры нуклеиновых кислот, используемых в данном документе, включают малую интерферирующую РНК с субстратом Dicer (dsiRNA), антисмысловую РНК, короткую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), microRNA (miRNA), aiRNA (асимметричную интерферирующую РНК), пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), морфолиновую нуклеиновую кислоту, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), piwi-взаимодействующую РНК (piRNA), рибозим, дезоксирибозимы (DNAzyme), аптамер (ДНК, РНК), кольцевую РНК (circRNA), направляющую РНК (gRNA) или молекулу ДНК.

Композиция для контроля патогенов, включающая описанную в данном документе нуклеиновую кислоту, может быть приведена в контакт с патогеном или его переносчиком в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации нуклеиновой кислоты и (b) уменьшения или устранения патогена. В некоторых случаях композицию для контроля патогенов, включающую описанную в данном документе нуклеиновую кислоту, можно вводить животному, инфицированному или подверженному риску инфицирования патогеном, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации нуклеиновой кислоты у животного и (b) уменьшения или устранения патогена. Нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию для контроля патогенов для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

(а) Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид

В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, могут иметь длину от приблизительно 10 до приблизительно 50000 нуклеотидов (нукл.), от приблизительно 25 до приблизительно 100 нукл., от приблизительно 50 до приблизительно 150 нукл., от приблизительно 100 до

приблизительно 200 нукл., от приблизительно 150 до приблизительно 250 нукл., от приблизительно 200 до приблизительно 300 нукл., от приблизительно 250 до приблизительно 350 нукл., от приблизительно 300 до приблизительно 500 нукл., от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нукл., от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нукл., от приблизительно 100 до приблизительно 1000 нукл., от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 нукл., от приблизительно 2000 до приблизительно 3000 нукл., от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 нукл., от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нукл., от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 нукл., от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нукл., от приблизительно 7000 до приблизительно 8000 нукл., от приблизительно 8000 до приблизительно 9000 нукл., от приблизительно 9000 до приблизительно 10000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 15000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 20000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 25000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 30000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 40000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 45000 нукл., от приблизительно 10000 до приблизительно 50000 нукл. или любой диапазон между ними.

Композиция для контроля патогенов может также содержать функционально активные варианты последовательности нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В некоторых случаях вариант нуклеиновых кислот характеризуется по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В некоторых случаях настоящее изобретение предусматривает функционально активный полипептид, кодируемый вариантом нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. В некоторых случаях функционально активный полипептид, кодируемый вариантом нуклеиновой кислоты, характеризуется по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью полипептида, представляющего интерес, или представляющей интерес полипептидной последовательности природного происхождения.

Некоторые способы экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, могут предусматривать экспрессию в клетках, в том числе клетках насекомых, клетках дрожжевых грибов, клетках растений, клетках бактерий или других клетках под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, и 5'- или 3'-нетранскрибируемые последовательности, такие как необходимые участки связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорный сайт

сплайсинга, акцепторный сайт сплайсинга и последовательности терминации. Последовательности ДНК, происходящие из генома вируса SV40, к примеру, точки начала репликации, раннего промотора, энхансера, сайтов сплайсинга и сайтов полиаденилирования SV40, можно применять для обеспечения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Green et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

Генетическая модификация с применением рекомбинантных способов является общеизвестной в данной области техники. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая необходимый ген, может быть получена с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, к примеру, скрининг библиотек на основе клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, содержит его, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих его, с помощью стандартных методик. В альтернативном случае ген, представляющий интерес, может быть получен синтетически, а не клонирован.

Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, как правило, достигается с помощью функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей ген, представляющий интерес, с промотором, и включения данной конструкции в вектор экспрессии. Векторы экспрессии могут быть подходящими для репликации и экспрессии в бактериях. Векторы экспрессии также могут быть подходящими для репликации и интеграции в эукариотах. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для экспрессии необходимой последовательности нуклеиновой кислоты.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 пар оснований (п. о.) выше от сайта начала транскрипции, хотя, как недавно было показано, ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала транскрипции. Область между промоторными элементами является гибкой, поэтому промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены друг по отношению к другу. В промоторе тимидинкиназы (tk) область между промоторными элементами может быть увеличена до 50 п. о. до того, как активность начинает снижаться. В зависимости от промотора, по-видимому, отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо с целью активации транскрипции.

Одним примером подходящего промотора является последовательность промотора гена немедленно-раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Данная промоторная последовательность представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способного управлять высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ним. Другим примером подходящего промотора является фактор элонгации 1 α (EF-1 α). Однако также

можно использовать другие последовательности конститутивных промоторов, включая без ограничения ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса рака молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как без ограничения промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинкиназы.

В альтернативном случае промотор может представлять собой индуцируемый промотор. Применение индуцируемого промотора предоставляет молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, в случае когда такая экспрессия является желательной, или выключение экспрессии, в случае если экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают без ограничения промотор гена металлотинина, промотор гена глюкокортикоидного рецептора, промотор гена прогестеронового рецептора и промотор гена устойчивости к тетрациклину.

Вектор экспрессии, подлежащий введению, также может содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, либо и то и другое с целью облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, подлежащих трансфекции или инфицированию посредством вирусных векторов. В других аспектах селективный маркер может быть перенесен на отдельном фрагменте ДНК и применен в процедуре котрансфекции. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы подходящими регуляторными последовательностями с целью обеспечения экспрессии в клетках хозяев. Пригодные селективируемые маркеры включают, к примеру, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т. п.

Репортерные гены можно применять для идентификации потенциально трансформированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует в источнике реципиента или не кодируется им и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется с помощью некоторого легко выявляемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после того, как ДНК была введена в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., FEBS Letters 479:79-82, 2000). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с помощью известных методик или приобретены коммерческим путем. Как правило, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующая наибольший уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценивания средств в отношении способности модулировать транскрипцию,

управляемую промотором.

В некоторых случаях организм может быть генетически модифицирован с целью изменения экспрессии одного или нескольких белков. Экспрессия одного или нескольких белков может быть модифицирована в течение определенного времени, например, состояния развития или дифференцировки организма. В одном случае в настоящем изобретении предусмотрена композиция для изменения экспрессии одного или нескольких белков, например, белков, которые влияют на активность, структуру или функцию. Экспрессия одного или нескольких белков может быть ограничена определенным(определенными) положением(положениями) или распространена по всему организму.

(b) Синтетическая mRNA

Композиция для контроля патогенов может содержать синтетическую молекулу mRNA, например, синтетическую молекулу mRNA, кодирующую полипептид. Синтетическая молекула mRNA может быть модифицированной, например, химически. Молекула mRNA может быть химически синтезирована или транскрибирована *in vitro*. Молекула mRNA может быть расположена в плазмиде, например, в вирусном векторе, бактериальном векторе или эукариотическом векторе экспрессии. В некоторых примерах молекула mRNA может быть доставлена в клетки с помощью трансфекции, электропорации или трансдукции (например, аденовирусной или лентивирусной трансдукции).

В некоторых случаях средство на основе модифицированной РНК, представляющее интерес, описанное в данном документе, имеет модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды. Такие модификации известны и описаны, например, в WO 2012/019168. Дополнительные модификации описаны, например, в WO 2015/038892; WO 2015/038892; WO 2015/089511; WO 2015/196130; WO 2015/196118 и WO 2015/196128 A2.

В некоторых случаях модифицированная РНК, кодирующая полипептид, представляющий интерес, имеет одну или несколько концевых модификаций, например, 5'-кэп-структуру и/или поли-А-хвост (например, от 100 до 200 нуклеотидов в длину). 5'-кэп-структура может быть выбрана из группы, состоящей из Cap0, Cap1, ARCA, инозина, N1-метилгуанозина, 2'-фторгуанозина, 7-деазагуанозина, 8-оксогуанозина, 2-аминогуанозина, LNA-гуанозина и 2-азидогуанозина. В некоторых случаях модифицированные РНК также содержат 5'-UTR, содержащую по меньшей мере одну последовательность Козак, и 3'-UTR. Такие модификации известны и описаны, например, в WO 2012/135805 и WO 2013/052523. Дополнительные концевые модификации описаны, например, в WO 2014/164253 и WO 2016/011306, WO 2012/045075 и WO 2014/093924. Химерные ферменты для синтеза кэпированных молекул РНК (например, модифицированной mRNA), которые могут содержать по меньшей мере одну химическую модификацию, описаны в WO 2014/028429.

В некоторых случаях модифицированная mRNA может быть циклизированной или конкатемеризованной с целью получения отвечающей требованиям трансляции молекулы

для облегчения взаимодействий между поли-А-связывающими белками и 5'-конец-связывающими белками. Механизм циклизации или конкатемеризации может осуществляться посредством по меньшей мере 3 различных путей: 1) химического, 2) ферментативного и 3) катализируемого рибозимами. Вновь образованная 5'-/3'-связь может быть внутримолекулярной или межмолекулярной. Такие модификации описаны, например, в WO 2013/151736.

Способы получения и очистки модифицированных РНК известны и раскрыты в данной области техники. К примеру, модифицированные РНК получают с помощью только ферментативного синтеза с использованием транскрипции *in vitro* (IVT). Способы получения полинуклеотидов IVT известны в данной области техники и описаны в WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151671, WO 2013/151672, WO 2013/151667 и WO 2013/151736. Способы очистки включают очистку РНК-транскрипта, содержащего поли-А-хвост, путем приведения образца в контакт с поверхностью, связанной со множеством тимидинов или их производных и/или множеством урацилов или их производных (polyT/U) в таких условиях, что РНК-транскрипт связывается с поверхностью, и элюирования очищенного РНК-транскрипта с поверхности (WO 2014/152031); применение ионо- (например, анионо-) обменной хроматографии, которая способствует разделению более длинных молекул РНК вплоть до 10000 нуклеотидов в длину посредством масштабируемого способа (WO 2014/144767); и обработку ДНКазой образца модифицированной mRNA (WO 2014/152030).

Составы на основе модифицированных РНК известны и описаны, например, в WO 2013/090648. К примеру, состав может представлять собой без ограничения наночастицы, микросферы на основе сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), липидоиды, липоплекс, липосому, полимеры, углеводы (включая простые сахара), катионные липиды, фибриновый гель, фибриновый гидрогель, фибриновый клей, фибриновый герметик, фибриноген, тромбин, быстро элиминируемые липидные наночастицы (reLNP) и их комбинации.

Модифицированные РНК, кодирующие полипептиды, в областях, связанных с заболеваниями человека, антителами, вирусами, и множества условий *in vivo* известны и раскрыты, к примеру, в таблице 6 международных публикаций №№ WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151736; таблицах 6 и 7 международной публикации № WO 2013/151672; таблицах 6, 178 и 179 международной публикации № WO 2013/151671; таблицах 6, 185 и 186 международной публикации № WO 2013/151667. Любое из вышеизложенного может быть синтезировано в виде полинуклеотида IVT, химерного полинуклеотида или кольцевого нуклеотида, и каждое может включать один или несколько модифицированных нуклеотидов или концевых модификаций.

(с) Ингибирующая РНК

В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает в себя

молекулу ингибирующей РНК, например, которая действует посредством пути РНК-интерференции (RNAi). В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень экспрессии гена у патогена или его переносчика. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень белка у патогена или его переносчика. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК подавляет экспрессию гена патогена. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК подавляет экспрессию гена у переносчика патогена. Например, молекула ингибирующей РНК может содержать короткую интерферирующую РНК, короткую шпилечную РНК и/или microRNA, которая целенаправленно воздействует на ген у патогена. Определенные молекулы РНК могут подавлять экспрессию генов путем биологического процесса РНК-интерференции (RNAi). Молекулы RNAi включают в себя РНК или РНК-подобные структуры, обычно содержащие 15-50 пар оснований (например, приблизительно 18-25 пар оснований) и обладающие последовательностью нуклеиновых оснований, идентичной (комплементарной) или почти идентичной (по существу комплементарной) кодирующей последовательности в экспрессируемом гене-мишени в клетке. Молекулы RNAi включают без ограничения: малые интерферирующие РНК с субстратом Dicer (dsiRNA), короткие интерферирующие РНК (siRNA), двухнитевые РНК (dsRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA), меродуплексы, субстраты dicer и мультивалентные интерферирующие РНК (патенты США №№ 8084599, 8349809, 8513207 и 9200276). shRNA представляет собой молекулу РНК, включающую в себя шпилечный оборот, которая обеспечивает снижение экспрессии генов-мишеней посредством RNAi. shRNA могут быть доставлены в клетки в виде плазмид, например вирусных или бактериальных векторов, например, с помощью трансфекции, электропорации или трансдукции). microRNA представляет собой некодирующую молекулу РНК, которая, как правило, имеет длину приблизительно 22 нуклеотида. MiRNA связываются с целевыми сайтами на молекулах mRNA и приводят к сайленсингу mRNA, например, вызывая расщепление mRNA, дестабилизацию mRNA или подавление трансляции mRNA. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень и/или активность отрицательного регулятора функции. В других случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень и/или активность ингибитора положительного регулятора функции. Молекула ингибирующей РНК может быть химически синтезирована или транскрибирована *in vitro*.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, РНК или PNA. В некоторых случаях РНК представляет собой ингибирующую РНК. В некоторых случаях ингибирующая РНК подавляет экспрессию гена у патогена. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой mRNA, модифицированную mRNA или молекулу ДНК, которая повышает экспрессию фермента у патогена (например, метаболической рекомбиназы, геликазы, интегразы, РНКазы, ДНКазы или белка убиквитинирования), порообразующего белка, сигнального лиганда, проникающего в клетку пептида, фактора транскрипции, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов (например, система CRISPR-Cas, TALEN или "цинковый палец"),

рибопротеина, белкового аптамера или шаперона. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой mRNA, модифицированную mRNA или молекулу ДНК, которая повышает экспрессию фермента (например, метаболического фермента, фермента на основе рекомбиназы, фермента на основе геликазы, фермента на основе интегразы, фермента на основе РНКазы, фермента на основе ДНКазы или белка убиквитинирования), порообразующего белка, сигнального лиганда, клеточного проникающего пептида, фактора транскрипции, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов (например, система CRISPR-Cas, TALEN или цинковый палец), рибопротеина, белкового аптамера или шаперона. В некоторых случаях повышение экспрессии у патогена представляет собой повышение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, экспрессией у необработанного патогена). В некоторых случаях повышение экспрессии у патогена представляет собой повышение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с эталонным уровнем (например, экспрессией у необработанного патогена).

В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолиновую нуклеиновую кислоту, LNA, piRNA, рибозим, ДНКзим, аптамер (ДНК, РНК), circRNA, gRNA или молекулы ДНК (например, антисмысловой полинуклеотид) для снижения экспрессии у патогена, например, фермента (метаболического фермента, фермента рекомбиназы, фермента хеликазы, фермента интегразы, фермента РНКазы, фермента ДНКазы, фермента полимеразы, белка, участвующего в убиквитинировании, фермента, осуществляющего контроль содержания супероксида, или фермента, отвечающего за выработку энергии), транскрипционного фактора, секреторного белка, структурного фактора (актина, кинезина или тубулина), рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или транспортера. В некоторых случаях снижение экспрессии у патогена представляет собой снижение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100% по сравнению с эталонным уровнем (например, экспрессией у необработанного патогена). В некоторых случаях снижение экспрессии у патогена представляет собой снижение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с эталонным уровнем (например, экспрессией у необработанного патогена).

Молекулы для RNAi содержат последовательность, по сути комплементарную или полностью комплементарную всему гену-мишени или его фрагменту. Молекулы для RNAi могут комплементарно дополнять последовательности на границе между интронами и экзонами с целью предупреждения созревания вновь образованных ядерных РНК-

транскриптов определенных генов в mRNA для транскрипции. Молекулы для RNAi, комплементарные определенным генам, могут гибридизироваться с mRNA для гена-мишени и предупреждать его трансляцию. Антисмысловая молекула может представлять собой ДНК, РНК или их производное или гибрид. Примеры таких производных молекул включают без ограничения пептидную нуклеиновую кислоту (PNA) и фосфотиоатные молекулы, такие как дезоксирибонуклеиновый гуанидин (DNG) или рибонуклеиновый гуанидин (RNG).

Молекулы для RNAi могут быть предусмотрены в виде "готовой к применению" РНК, синтезированной *in vitro*, или в виде антисмыслового гена, трансфицированного в клетки, что приведет к образованию молекул для RNAi при транскрипции. Гибридизация с mRNA приводит к разрушению гибридизированной молекулы РНКазой H и/или подавлению образования трансляционных комплексов. И то и другое приводит к невозможности продуцировать продукт исходного гена.

Длина молекулы для RNAi, которая гибридизуется с транскриптом, представляющим интерес, может составлять около 10 нуклеотидов, от приблизительно 15 до 30 нуклеотидов или приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или больше нуклеотидов. Степень идентичности антисмысловой последовательности с целевым транскриптом может составлять по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%.

Молекулы для RNAi также могут содержать выступающие концы, т. е., как правило, неспаренные выступающие нуклеотиды, которые непосредственно не вовлечены в двойную спиральную структуру, обычно образуемую коровыми последовательностями определенной в данном документе пары смысловой и антисмысловой нити. Молекулы для RNAi могут содержать 3'- и/или 5'-выступающие концы из приблизительно 1-5 оснований независимо на каждой из смысловых нитей и антисмысловых нитей. В некоторых случаях как смысловая нить, так и антисмысловая нить содержат 3'- и 5'-выступающие концы. В некоторых случаях один или несколько нуклеотидов 3'-выступающего конца одной нити спариваются основаниями с одним или несколькими нуклеотидами 5'-выступающего конца другой нити. В других случаях один или несколько нуклеотидов 3'-выступающего конца одной нити не спариваются основаниями с одним или несколькими нуклеотидами 5'-выступающего конца другой нити. Смысловая и антисмысловая нити молекулы для RNAi могут содержать или могут не содержать одинаковое количество нуклеотидных оснований. Антисмысловая и смысловая нити могут образовывать дуплекс, при этом только 5'-конец имеет тупой конец, только 3'-конец имеет тупой конец, как 5'-, так и 3'-концы заканчиваются тупым концом, или ни 5'-, ни 3'-конец не заканчивается тупым концом. В другом случае один или несколько нуклеотидов в выступающем конце содержат тиофосфат, фосфотиоат, дезоксинуклеотидный инвертированный (связанный в направлении от 3' до 3') нуклеотид или представляют собой модифицированный рибонуклеотид или дезоксинуклеотид.

Молекулы малой интерферирующей РНК (siRNA) содержат нуклеотидную последовательность, которая является идентичной участку от приблизительно 15 до приблизительно 25 смежных нуклеотидов целевой mRNA. В некоторых случаях последовательность siRNA начинается динуклеотидом AA, характеризуется содержанием GC приблизительно 30-70% (приблизительно 30-60%, приблизительно 40-60% или приблизительно 45%-55%) и не характеризуется высоким процентом идентичности по отношению к любой нуклеотидной последовательности, отличной от мишени в геноме, в который она подлежит введению, к примеру, определенной с помощью стандартного поиска BLAST.

siRNA и shRNA имеют сходство с промежуточными соединениями в пути процессинга генов эндогенных микроРНК (miRNA) (Bartel, Cell 116:281-297, 2004). В некоторых случаях siRNA могут функционировать в качестве miRNA и наоборот (Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333, 2002; Doench et al., Genes Dev. 17:438-442, 2003). Экзогенные siRNA снижают экспрессию mRNA с помощью затравочной области, комплементарной siRNA (Birmingham et al., Nat. Methods 3:199-204, 2006). Несколько целевых сайтов в 3'-UTR обеспечивают более сильное снижение экспрессии (Doench et al., Genes Dev. 17:438-442, 2003).

Известные эффективные последовательности siRNA и когнатные связывающие сайты также хорошо представлены в соответствующей литературе. Молекулы для RNAi без труда разрабатывают и получают с помощью технологий, известных в данной области техники. Помимо этого, существуют компьютерные средства, которые повышают вероятность обнаружения эффективных и специфических мотивов последовательностей (Pei et al., Nat. Methods 3(9):670-676, 2006; Reynolds et al., Nat. Biotechnol. 22(3):326-330, 2004; Khvorova et al., Nat. Struct. Biol. 10(9):708-712, 2003; Schwarz et al., Cell 115(2):199-208, 2003; Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res. 32(3):936-948, 2004; Heale et al., Nucleic Acids Res. 33(3):e30, 2005; Chalk et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319(1):264-274, 2004; и Amarzguioui et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 316(4):1050-1058, 2004).

Молекула для RNAi модулирует экспрессию РНК, кодируемую геном. Поскольку многочисленные гены могут разделять некоторую степень гомологии последовательностей друг с другом, в некоторых случаях молекула RNAi может быть сконструирована таким образом, чтобы целенаправленно воздействовать на класс генов с достаточной гомологией последовательностей. В некоторых случаях молекула для RNAi может содержать последовательность, которая характеризуется комплементарностью по отношению к последовательностям, которые являются общими среди различных генных мишеней или являются уникальным в отношении определенной генной мишени. В некоторых случаях молекула для RNAi может быть сконструирована таким образом, чтобы целенаправленно воздействовать на консервативные области последовательности РНК, характеризующиеся гомологией между несколькими генами, тем самым целенаправленно воздействуя на несколько генов в семействе генов (например, различные изоформы генов, сплайс-варианты, мутантные гены и т. д.). В некоторых случаях

молекула для RNAi может быть сконструирована с целью целенаправленного воздействия на последовательность, которая является уникальной в отношении определенной последовательности РНК одного гена.

Молекула ингибирующей РНК может быть модифицированной, например, с содержанием модифицированных нуклеотидов, например, 2'-фтор, 2'-о-метил, 2'-дезоксидезокси, незамкнутой нуклеиновой кислоты, 2'-гидрокси, фосфотиоата, 2'-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 2'-дезокситуридина. Не ограничиваясь теорией, считается, что такие модификации могут повышать устойчивость к нуклеазе и/или стабильность в сыворотке крови или снижать иммуногенность.

В некоторых случаях молекула для RNAi связывается с полимером для доставки с помощью физиологически неустойчивой связи или линкера. Физиологически неустойчивый линкер выбирают таким образом, что он подвергается химической трансформации (например, расщеплению) при присутствии в определенных физиологических условиях (например, дисульфидная связь, расщепляемая в восстанавливающей среде цитоплазмы клетки). Высвобождение молекулы из полимера в результате расщепления физиологически неустойчивой связи облегчает взаимодействие молекулы с подходящими клеточными компонентами с целью обеспечения активности.

Конъюгат молекула для RNAi-полимер может быть образован с помощью ковалентного связывания молекулы с полимером. Полимер полимеризуют или модифицируют таким образом, что он содержит реакционную группу А. Молекулу для RNAi также полимеризуют или модифицируют таким образом, что она содержит реакционную группу В. Реакционные группы А и В выбирают таким образом, что они могут связываться посредством обратимой ковалентной связи с помощью способов, известных в данной области техники.

Конъюгация молекулы для RNAi с полимером может быть выполнена в присутствии избытка полимера. Поскольку молекула для RNAi и полимер могут иметь разный заряд во время конъюгации, наличие избытка полимера может приводить к снижению или устранению агрегации конъюгата. В альтернативном случае можно применять избыток полимера-носителя, такого как поликатион. Избыток полимера может быть удален из конъюгированного полимера перед введением конъюгата. В альтернативном случае избыток полимера может быть введен совместно с конъюгатом.

Инъекция двухнитевой РНК (dsRNA) в организм материнских особей насекомых приводит к эффективному подавлению экспрессии генов их потомства во время эмбриогенеза, см., например, Khila et al., *PLoS Genet.* 5(7):e1000583, 2009 и Liu et al., *Development* 131(7):1515-1527, 2004. Matsuura et al. (*PNAS* 112(30):9376-9381, 2015) показали, что подавление *Ubx* приводит к устранению бактериоцитов и расположения бактериоцитов в симбионте.

Получение и применение ингибирующих средств на основе некодирующей РНК, такой как рибозимы, РНКазы Р, молекулы для siRNA и miRNA, также известно в данной области техники, к примеру, как описано в Sioud, *RNA Therapeutics: Function, Design, and*

Delivery (Methods in Molecular Biology). Humana Press (2010).

(d) Редактирование генов

Композиции для контроля патогенов, описанные в данном документе, могут включать в себя компонент системы редактирования генов. Например, средство может вносить изменение (например, вставку, делецию (например, нокаут), транслокацию, инверсию, точечную мутацию или другую мутацию) в ген патогена. Иллюстративные системы редактирования генов включают нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активаторам транскрипции (TALEN), и системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR). Способы на основе ZFN, TALEN и CRISPR описаны, например, в Gaj et al., *Trends Biotechnol.* 31(7):397-405, 2013.

В типичной системе CRISPR/Cas эндонуклеаза направлена на целевую нуклеотидную последовательность (например, сайт в геноме, который подлежит редактированию последовательности) с помощью специфических в отношении последовательности некодирующих направляющих РНК, которые целенаправленно воздействуют на одно- или двухнитевые последовательности ДНК. Было идентифицировано три класса (I-III) систем CRISPR. В системах CRISPR II класса используется одна эндонуклеаза Cas (вместо нескольких белков Cas). Одна система CRISPR II класса включает эндонуклеазу Cas II типа, такую как Cas9, CRISPR-РНК (crRNA) и транс-активирующую crRNA (tracrRNA). crRNA содержит направляющую РНК, т. е., как правило, последовательность РНК из приблизительно 20 нуклеотидов, которая соответствует целевой последовательности ДНК. crRNA также содержит область, которая связывается с tracrRNA с образованием частично двухнитевой структуры, которая расщепляется РНКазой III, что приводит к образованию гибрида crRNA/tracrRNA. РНК выступают в качестве направляющих последовательностей для направления белков Cas к специфическим в отношении сайленсинга последовательностям ДНК/РНК, в зависимости от спейсерной последовательности. См., например, Horvath et al., *Science* 327:167-170, 2010; Makarova et al., *Biology Direct* 1:7, 2006; Pennisi, *Science* 341:833-836, 2013. Последовательность ДНК-мишени должна, как правило, прилегать к мотиву, прилегающему к протоспейсеру (PAM), который является специфичным для определенной эндонуклеазы Cas; однако, последовательности PAM встречаются по всему рассматриваемому геному. Эндонуклеазы CRISPR, идентифицированные у различных прокариотических видов, обладают уникальными требованиями к последовательностям PAM; примеры последовательностей PAM включают 5'-NGG (SEQ ID NO: 78) (*Streptococcus pyogenes*), 5'-NNAGAA (SEQ ID NO: 79) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR1), 5'-NGGNG (SEQ ID NO: 80) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR3) и 5'-NNGATT (SEQ ID NO: 81) (*Neisseria meningitidis*). Некоторые эндонуклеазы, например, эндонуклеазы Cas9, ассоциированы с сайтами PAM с высоким содержанием G, например, 5'-NGG (SEQ ID NO: 78), и осуществляют расщепление с образованием тупых концов целевой ДНК в положении на 3 нуклеотида выше от (от 5') сайта PAM. Другая система

CRISPR II класса содержит эндонуклеазу Cpf1 V типа, которая имеет меньший размер, чем Cas9; примеры включают AsCpf1 (из *Acidaminococcus* sp.) и LbCpf1 (из *Lachnospiraceae* sp.). Cpf1-ассоциированные матрицы CRISPR подвергаются процессингу в зрелые crRNA без потребности в tracrRNA; другими словами, для системы Cpf1 требуются только нуклеазы Cpf1 и crRNA для расщепления целевой последовательности ДНК. Эндонуклеазы Cpf1 ассоциированы с сайтами PAM с высоким содержанием Т, например, 5'-TTN. Cpf1 также может распознавать PAM-мотив 5'-СТА. Cpf1 расщепляет ДНК-мишень посредством введения смещенного или ступенчатого двухнитевого разрыва с образованием 5'-выступающего конца длиной 4 или 5 нуклеотидов, например, посредством расщепления ДНК-мишени с образованием смещенного или ступенчатого разреза, охватывающего 5 нуклеотидов, расположенного на 18 нуклеотидов ниже сайта PAM (в 3'-направлении от него) на кодирующей нити и на 23 нуклеотида ниже сайта PAM на комплементарной нити; при этом выступающий конец длиной 5 нуклеотидов, который образуется в результате такого смещенного расщепления, обеспечивает возможность более точного редактирования генома посредством вставки ДНК путем гомологичной рекомбинации по сравнению со вставкой в ДНК, подвергнутой расщеплению с образованием тупых концов. См., например, Zetsche et al., *Cell* 163:759-771, 2015.

В целях редактирования генома матрицы CRISPR могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать одну или множество последовательностей направляющей РНК, соответствующих необходимой целевой последовательности ДНК; см., например, Cong et al., *Science* 339:819-823, 2013; Ran et al., *Nature Protocols* 8:2281-2308, 2013. По меньшей мере приблизительно 16 или 17 нуклеотидов из последовательности gRNA требуется Cas9 для того, чтобы произошло расщепление ДНК; в случае Cpf1 по меньшей мере приблизительно 16 нуклеотидов из последовательности gRNA необходимо для достижения расщепления ДНК, поддающегося выявлению. На практике последовательности направляющей РНК, как правило, конструируют таким образом, чтобы они имели длину от 17 до 24 нуклеотидов (например, 19, 20 или 21 нуклеотидов) и комплементарность по отношению к последовательности гена-мишени или нуклеиновой кислоты. Специализированные генераторы и алгоритмы для создания gRNA являются коммерчески доступными для применения в разработке эффективных направляющих РНК. Редактирование генов также осуществляли с помощью химерных одиночных направляющих РНК (sgRNA), сконструированной (синтетической) одиночной молекулы РНК, которая имитирует встречающийся в природе комплекс crRNA-tracrRNA и содержит как tracrRNA (для связывания с нуклеазой), так и по меньшей мере одну crRNA (для направления нуклеазы к последовательности, которая служит мишенью для редактирования). Также было продемонстрировано, что химически модифицированные sgRNA являются эффективными в редактировании геномов; см., например, Hendel et al., *Nature Biotechnol.* 985-991, 2015.

В то время как Cas9 дикого типа приводит к образованию двухнитевых разрывов (DSB) в определенных последовательностях ДНК, в отношении которых происходит

целенаправленное воздействие gRNA, доступен ряд эндонуклеаз CRISPR, имеющих модифицированные функциональные свойства, к примеру: версия никазы Cas9 приводит к образованию только однонитевого разрыва; каталитически неактивный Cas9 (dCas9) не разрезает целевую ДНК, однако нарушает транскрипцию в результате стерического затруднения. dCas9 может быть дополнительно слит с эффектором для обеспечения репрессии (CRISPRi) или активации (CRISPRa) экспрессии целевого гена. К примеру, Cas9 может быть слит с транскрипционным репрессором (например, доменом KRAB) или транскрипционным активатором (например, слияние dCas9-VP64). Каталитически неактивный Cas9 (dCas9), слитый с нуклеазой FokI (dCas9-FokI), может быть использован для образования DSB в целевых последовательностях, гомологичных двум gRNA. См., например, многочисленные плазмиды на основе CRISPR/Cas9, раскрытые в репозитории Addgene (Addgene, 75 Sidney St., Suite 550A, Cambridge, MA 02139; addgene.org/crispr/) и публично доступные из него. Двойная никаза Cas9, которая вводит два отдельных двухнитевых разрыва, каждый из которых направляется отдельной направляющей РНК, описана как достигающая более точного редактирования генома Ran et al., Cell 154:1380-1389, 2013.

Технология CRISPR для редактирования генов эукариот раскрыта в публикациях заявки на патент США US 2016/0138008 A1 и US 2015/0344912 A1 и в патентах США 8697359, 8771945, 8945839, 8999641, 8993233, 8895308, 8865406, 8889418, 8871445, 8889356, 8932814, 8795965 и 8906616. Эндонуклеаза Cpf1 и соответствующие направляющие РНК и сайты PAM раскрыты в публикации заявки на патент США 2016/0208243 A1.

В некоторых случаях необходимая модификация генома включает в себя гомологическую рекомбинацию, при этом один или несколько двухнитевых разрывов ДНК в целевой нуклеотидной последовательности образуются с помощью направляемой РНК нуклеазы и направляющей(-их) РНК с последующей репарацией разрыва(разрывов) путем механизма гомологичной рекомбинации (репарации, направляемой гомологией). В таких случаях донорная матрица, которая кодирует необходимую нуклеотидную последовательность, подлежащую вставке или нокированию в двухнитевом разрыве, предусмотрена для клетки или субъекта; примеры подходящих матриц включают однонитевые матрицы ДНК и двухнитевые матрицы ДНК (например, связанные с полипептидом, описанным в данном документе). Как правило, донорная матрица, кодирующая нуклеотидное изменение на протяжении участка менее чем приблизительно 50 нуклеотидов, предусмотрена в виде однонитевой ДНК; более крупные донорные матрицы (например, более чем 100 нуклеотидов) часто предусмотрены в виде плазмид на основе двухнитевой ДНК. В некоторых случаях донорная матрица предусмотрена для клетки или субъекта в количестве, которое является достаточным для достижения необходимой репарации, направляемой гомологией, но она не сохраняется в клетке или у субъекта после определенного периода времени (например, после одного или нескольких циклов клеточного деления). В некоторых случаях донорная матрица имеет коровую

нуклеотидную последовательность, которая отличается от целевой нуклеотидной последовательности (например, гомологичной эндогенной геномной области) на по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или больше нуклеотидов. Указанная коровая последовательность фланкируется гомологичными плечами или областями с высокой идентичностью последовательности по отношению к целевой нуклеотидной последовательности; в некоторых случаях области высокой идентичности включают по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 750 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов с каждой стороны коровой последовательности. В некоторых случаях, если донорная матрица находится в виде однострессовой ДНК, - коровая последовательность фланкируется гомологичными плечами, включающими по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80 или по меньшей мере 100 нуклеотидов с каждой стороны коровой последовательности. В случаях если донорная матрица находится в виде двухстрессовой ДНК, - коровая последовательность фланкируется гомологичными плечами, включающими по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов с каждой стороны коровой последовательности. В одном случае два отдельных двухстрессовых разрыва вводят в клетку или целевую нуклеотидную последовательность субъекта с помощью двойной системы Cas9 (см. Ran et al., Cell 154:1380-1389, 2013) с последующей доставкой донорной матрицы.

В некоторых случаях композиция включает в себя gRNA и нацеленную нуклеазу, например Cas9, например Cas9 дикого типа, систему Cas9 (например, Cas9 D10A), неактивную форму Cas9 (dCas9), eSpCas9, Cpf1, C2C1 или C2C3 или нуклеиновую кислоту, кодирующую такую нуклеазу. Выбор нуклеазы и gRNA определяется тем, представляет ли собой целевая мутация делецию, замену или добавление нуклеотидов, например, делецию, замену или добавление нуклеотидов по отношению к целевой последовательности. Слияния каталитически неактивной эндонуклеазы, например, неактивной формы Cas9 (dCas9, например, D10A; H840A), связанной со всей или частью (например, биологически активной частью) (одного или нескольких) эффекторных доменов приводят к образованию химерных белков, которые могут быть слиты с полипептидом с целью направления композиции к определенным сайтам ДНК с помощью одной или нескольких последовательностей РНК (sgRNA) для модулирования активности и/или экспрессии одной или нескольких целевых последовательностей нуклеиновых кислот.

В некоторых случаях средство включает направляющую РНК (gRNA) для применения в системе CRISPR для редактирования генов. В некоторых случаях средство включает нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN) или mRNA, кодирующую ZFN,

которая целенаправленно воздействует на (например, расщепляет) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена патогена. В некоторых случаях средство включает TALEN или mRNA, кодирующую TALEN, которая целенаправленно воздействует на (например, расщепляет) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) в гене патогена.

Например, gRNA можно использовать в системе CRISPR для конструирования изменения гена у патогена. В других примерах ZFN и/или TALEN можно использовать для конструирования изменения гена у патогена. Иллюстративные изменения включают вставки, делеции (например, нокауты), транслокации, инверсии, точечные мутации или другие мутации. Изменение может быть введено в ген в клетке, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых примерах изменение повышает уровень и/или активность гена у патогена. В других примерах изменение снижает уровень и/или активность (например, приводит к нокдауну или нокауту) гена у патогена. В еще одном примере изменение исправляет дефект (например, мутацию, вызывающую дефект) в гене у патогена.

В некоторых случаях система CRISPR используется для редактирования (например, для добавления или удаления пары оснований) гена-мишени у патогена. В других случаях система CRISPR применяется для введения преждевременного стоп-кодона, например, со снижением тем самым экспрессии гена-мишени. В еще одних случаях система CRISPR применяется для отключения гена-мишени обратимым образом, например, аналогично РНК-интерференции. В некоторых случаях система CRISPR применяется для направления Cas к промотору гена, со стерическим блокированием тем самым РНК-полимеразы.

В некоторых случаях может быть создана система CRISPR для редактирования гена у патогена с использованием технологии, описанной, например, в публикации США № 20140068797, Cong, Science 339: 819-823, 2013; Tsai, Nature Biotechnol. 32:6 569-576, 2014; патентах США №№ 8871445; 8865406; 8795965; 8771945 и 8697359.

В некоторых случаях методика CRISPR-интерференции (CRISPRi) может использоваться для репрессии транскрипции определенных генов у патогена. В случае CRISPRi сконструированный белок Cas9 (например, нулевая нуклеаза dCas9 или слитый белок dCas9, например, слияние dCas9-KRAB или dCas9-SID4X) может спариваться со специфической в отношении последовательности направляющей РНК (sgRNA). Комплекс Cas9-gRNA может блокировать РНК-полимеразу, тем самым препятствуя элонгации транскрипта. Данный комплекс также может блокировать инициацию транскрипции путем препятствования связыванию с транскрипционными факторами. Способ CRISPRi является специфическим с минимальными нецелевыми эффектами и мультиплексным, например, может одновременно приводить к репрессии более одного гена (например, с помощью нескольких gRNA). Кроме того, способ CRISPRi обеспечивает обратимую репрессию генов.

В некоторых случаях активация гена, опосредованная CRISPR (CRISPRa), может использоваться для активации транскрипции гена у патогена. В случае методики CRISPRa

слитые белки dCas9 обеспечивают рекрутинг транскрипционных активаторов. Например, dCas9 может быть слит с полипептидами (например, доменами активации), такими как VP64 или доменом активации p65 (p65D), и использован совместно с sgRNA (например, одиночной sgRNA или несколькими sgRNA) с целью активации гена или генов у патогена. Многочисленные активаторы могут быть подвергнуты рекрутингу с помощью многочисленных sgRNA, причем это может обеспечивать повышение эффективности активации. Можно применять ряд доменов активации и одиночные или множественные домены активации. Помимо конструирования dCas9 с целью рекрутинга активаторов, также для рекрутинга активаторов могут быть сконструированы sgRNA. Например, РНК-аптамеры могут быть включены в sgRNA с целью рекрутинга белков (например, доменов активации), таких как VP64. В некоторых примерах системы посредников синергетической активации (SAM) можно применять для активации транскрипции. В случае SAM MS2-аптамеры добавляют к sgRNA. MS2 способствует рекрутингу белка оболочки MS2 (MCP), слитого с p65AD и фактором теплового шока 1 (HSF1).

Методики CRISPRi и CRISPRa описаны более подробно, например, в Dominguez et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17:5-15, 2016, включенном в данный документ посредством ссылки. Кроме того, для модуляции гена у патогена могут использоваться опосредованные dCas9 эпигенетические модификации и одновременная активация и репрессия с использованием систем CRISPR, как описано у Dominguez et al.

iii. Низкомолекулярные соединения

В некоторых случаях композиция для контроля патогенов включает в себя низкомолекулярное соединение, например биологическое низкомолекулярное соединение. Многочисленные средства на основе низкомолекулярных соединений пригодны в способах и композициях, описанных в данном документе.

Низкомолекулярные соединения включают без ограничения низкомолекулярные пептиды, пептидомиметики (например, пептоиды), аминокислоты, аналоги аминокислот, синтетические полинуклеотиды, аналоги полинуклеотидов, нуклеотиды, аналоги нуклеотидов, органические и неорганические соединения (включая гетероорганические и металлоорганические соединения), как правило, характеризующиеся молекулярной массой менее чем приблизительно 5000 грамм на моль, например, органические или неорганические соединения, характеризующиеся молекулярной массой менее чем приблизительно 2000 грамм на моль, например, органические или неорганические соединения, характеризующиеся молекулярной массой менее чем приблизительно 1000 грамм на моль, например, органические или неорганические соединения, характеризующиеся молекулярной массой менее чем приблизительно 500 грамм на моль, а также соли, сложные эфиры и другие фармацевтически приемлемые формы таких соединений.

Низкомолекулярное соединение, описанное в данном документе, может быть составлено в композицию или ассоциировано с РМР для любой из композиций для контроля патогенов или соответствующих способов, описанных в данном документе.

Композиции, раскрытые в данном документе, могут содержать любое количество или тип (например, классы) низкомолекулярных соединений, например, по меньшей мере приблизительно любое количество из 1 малой молекулы, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или большего количества низкомолекулярных соединений. Подходящая концентрация каждого низкомолекулярного соединения в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность низкомолекулярного соединения, количество различных низкомолекулярных соединений, состав и способы применения композиции. В некоторых случаях, если композиция включает в себя по меньшей мере два типа низкомолекулярных соединений, то концентрация каждого типа низкомолекулярного соединения может быть одной и той же или разной.

Композиция для контроля патогенов, включающая описанное в данном документе низкомолекулярное соединение, может быть приведена в контакт с патогеном или его переносчиком в количестве и в течение времени, достаточных для: (a) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации низкомолекулярного соединения внутри патогена или его переносчика или на них и (b) снижения приспособленности патогена.

В некоторых случаях композицию для контроля патогенов, включающую описанное в данном документе низкомолекулярное соединение, можно вводить животному, инфицированному или подверженному риску инфицирования патогеном, в количестве и в течение времени, достаточных для: (a) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации низкомолекулярного соединения у животного и (b) уменьшения или устранения патогена.

В некоторых случаях композиция для контроля патогенов согласно композициям и способам, описанным в данном документе, содержит вторичный метаболит. Вторичные метаболиты образуются из органических молекул, продуцируемых организмом. Вторичные метаболиты могут выступать (i) в качестве конкурентных средств, применяемых в отношении бактерий, грибов, амёб, растений, насекомых и крупных животных; (ii) в качестве средств, транспортирующих металлы; (iii) в качестве средств, способствующих симбиозу между микроорганизмами и растениями, насекомыми и более крупными животными; (iv) в качестве половых гормонов и (v) в качестве эффекторов дифференцировки.

Вторичный метаболит, применяемый в данном документе, может включать метаболит из любой известной группы вторичных метаболитов. Например, вторичные метаболиты можно классифицировать на следующие группы: алкалоиды, терпеноиды, флавоноиды, гликозиды, природные фенолы (например, госсиполуксусная кислота), енали (например, транс-коричный альдегид), феназины, бифенолы и дибензофураны, поликетиды, пептиды синтазы жирных кислот, нерибосомальные пептиды, пептиды, синтезируемые рибосомами и подвергающиеся посттрансляционным модификациям, полифенолы, полисахариды (например, хитозан) и биополимеры. Углубленный обзор вторичных метаболитов см., например, в Vining, *Annu. Rev. Microbiol.* 44:395-427, 1990.

VI. Наборы

Настоящее изобретение также предусматривает набор для контроля, предупреждения или лечения заболеваний, вызываемых патогенами животных, или для контроля переносчиков таких патогенов, где набор включает контейнер, содержащий композицию для контроля патогенов, описанную в данном документе. Набор может дополнительно включать инструкции по применению или доставке (например, животному, патогену животного или переносчику патогена животного) композиции для контроля патогенов для контроля, предупреждения или лечения инфекции в соответствии со способом по настоящему изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что инструкции по применению композиции для контроля патогенов в способах по настоящему изобретению могут являться инструкциями, представленными в любой форме. Такие инструкции включают без ограничения письменные инструкции (например, этикетку, буклет, брошюру), устные инструктивные материалы (например, представленные на аудиокассете или CD) или видеоинструкции (например, представленные на видеокассете или DVD).

ПРИМЕРЫ

Далее представлен пример способов по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике возможно осуществление различных других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Пример 1. Выделение пакетов-мессенджеров растений из растений

В данном примере продемонстрировано выделение неочищенных пакетов-мессенджеров растений (РМР) из различных растительных источников, включая апопласт листа, апопласт семени, корень, плод, овощ, пыльцу, флоэму, ксилемный сок и среду для культивирования клеток растений.

Схема эксперимента

*a) Выделение РМР из апопласта листьев *Arabidopsis thaliana**

Семена растения рода *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* Col-0) подвергали поверхностной стерилизации с помощью 50% отбеливателя и высевали на среду 0,53 Мурасиге-Скуга, содержащую 0,8% агара. Семена яровизировали в течение 2 дней при 4°C перед перемещением в условия короткого дня (9-часовые дни, 22°C, 150 мкЕм⁻²). Через 1 неделю проростки переносили в Pro-Mix PGX. Растения выращивали в течение 4-6 недель до сбора.

РМР выделяли из жидкости, полученной в результате промывки апопласта 4-6-недельных розеток растения рода *Arabidopsis*, как описано Rutter и Innes, *Plant Physiol.* 173 (1): 728-741, 2017. Вкратце, целые розетки собирали у корня и инфильтрировали под вакуумом буфером для выделения везикул (20 mM MES, 2 mM CaCl₂ и 0,1 M NaCl, pH 6). Инфильтрованные растения осторожно промокивали для удаления излишков жидкости, помещали в шприцы на 30 мл и центрифугировали в конических пробирках объемом 50 мл при 700 g в течение 20 мин. при 2°C для сбора внеклеточной жидкости апопласта, содержащей EV. Затем внеклеточную жидкость апопласта фильтровали через фильтр с

размером пор 0,85 мкм для удаления крупных частиц и РМР очищали, как описано в **примере 2**.

b) Выделение РМР из апопласта семян подсолнечника

Интактные семена подсолнечника (*H. annuus* L.) замачивали в воде на 2 часа, очищали с удалением околоплодника и экстрагировали внеклеточную жидкость апопласта с помощью модифицированной процедуры вакуумной инфльтрации-центрифугирования, основанной на Regente et al, *FEBS Letters*. 583: 3363-3366, 2009. Вкратце, семена погружали в буфер для выделения везикул (20 mM MES, 2 mM CaCl₂ и 0,1 M NaCl, pH 6) и подвергали действию трех вакуумных импульсов продолжительностью 10 с, разделенных интервалами 30 с, при давлении 45 кПа. Инфльтрованные семена извлекали, высушивали на фильтровальной бумаге, помещали в пористые стеклянные фильтры и центрифугировали в течение 20 мин. при 400 g при 4°C. Внеклеточную жидкость апопласта извлекали, фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм с удалением крупных частиц и РМР очищали, как описано в **примере 2**.

c) Выделение РМР из корней имбиря

Свежие корневищные корни имбиря (*Zingiber officinale*) приобретали у местного поставщика и промывали 3х с помощью PBS. Всего 200 граммов помытых корней измельчали в смесителе (12-скоростной измельчитель Osterizer) на наиболее высокой скорости в течение 10 мин. (пауза 1 мин. на каждую 1 мин. измельчения-смешивания) и выделяли РМР, как описано в Zhuang et al., *J Extracellular Vesicles*. 4(1):28713, 2015. Вкратце, имбирный сок последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин., при 3000 g в течение 20 мин. и при 10000 g в течение 40 мин. с удалением крупных частиц из супернатанта, содержащего РМР. РМР очищали, как описано в **примере 2**.

d) Выделение РМР из грейпфрутового сока

Свежие грейпфруты (*Citrus × paradisi*) приобретали у местного поставщика, их кожицу удаляли, а плоды выжимали вручную или измельчали в смесителе (12-скоростной измельчитель Osterizer) на наиболее высокой скорости в течение 10 мин. (пауза 1 мин. на каждую минуту измельчения-смешивания) со сбором сока, как описано в Wang et al., *Molecular Therapy*. 22(3): 522-534, 2014, с незначительными модификациями. Вкратце, сок/мякоть сока последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин., при 3000 g в течение 20 мин. и при 10000 g в течение 40 мин. с удалением крупных частиц из супернатанта, содержащего РМР. РМР очищали, как описано в **примере 2**.

e) Выделение РМР из головок брокколи

РМР брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica*) выделяли, как описано ранее (Deng et al., *Molecular Therapy*, 25(7): 1641-1654, 2017). Вкратце, свежую брокколи приобретали у местного поставщика, трижды промывали с помощью PBS и измельчали в смесителе (12-скоростной измельчитель Osterizer) на максимальной скорости в течение 10 мин. (пауза 1 мин. на каждую минуту измельчения-смешивания). Затем сок брокколи последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин., при 3000 g в течение 20 мин. и при 10000 g в течение 40 мин. с удалением крупных частиц из супернатанта, содержащего РМР. РМР

очищали, как описано в **примере 2**.

f) Выделение РМР из пыльцы оливы

РМР из пыльцы оливы (*Olea europaea*) выделяли, как ранее описано в Prado et al., *Molecular Plant*. 7(3):573-577, 2014. Вкратце, пыльцу оливы (0,1 г) гидратировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин. перед переносом в чашки Петри (диаметром 15 см), содержащие 20 мл среды для проращивания: 10% сахарозы, 0,03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01% KNO_3 , 0,02% MgSO_4 и 0,03% H_3BO_3 . Пыльцу проращивали при 30°C в темноте в течение 16 ч. Пыльцевые зерна считались проросшими только когда длина трубки превышала диаметр пыльцевого зерна. Культуральную среду, содержащую РМР, собирали и очищали от остатков пыльцы путем двух последовательных фильтраций на фильтрах с размером пор 0,85 мкм путем центрифугирования. РМР очищали, как описано в **примере 2**.

g) Выделение РМР из флоэмного сока растения рода *Arabidopsis*

Семена растения рода *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* Col-0) подвергали поверхностной стерилизации с помощью 50% отбеливателя и высевали на среду 0,53 Мурасиге-Скуга, содержащую 0,8% агара. Семена яровизировали в течение 2 дней при 4°C перед перемещением в условия короткого дня (9-часовые дни, 22°C, 150 мкЕм⁻²). Через 1 неделю проростки переносили в Pro-Mix PGX. Растения выращивали в течение 4-6 недель до сбора.

Флоэмный сок из 4-6-недельных листьев розеток растения рода *Arabidopsis* собирали, как описано Tetyuk et al., *JoVE* 80, 2013. Вкратце, листья срезали у основания черешка, складывали в стопки и помещали в пробирку для реакций, содержащую 20 мМ K₂-EDTA, на один час в темноте, чтобы предупредить закупорку раны. Листья осторожно удаляли из емкости, тщательно промывали дистиллированной водой с удалением всей EDTA, помещали в чистую пробирку и флоэмный сок собирали в течение 5-8 часов в темноте. Листья удаляли, флоэмный сок фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм с удалением крупных частиц и РМР очищали, как описано в **примере 2**.

h) Выделение РМР из ксилемного сока растения томата

Семена томата (*Solanum lycopersicum*) высаживали в один горшок в богатую органическими веществами почву, такую как Sunshine Mix (Sun Gro Horticulture, Агавам, Массачусетс), и выдерживали в теплице при температуре от 22°C до 28°C. Приблизительно через две недели после прорастания, на стадии двух настоящих листьев, проростки по отдельности пересаживали в горшки (диаметром 10 см и глубиной 17 см), заполненные стерильной песчаной почвой, содержащей 90% песка и 10% смеси органических веществ. Растения выдерживали в теплице при температуре 22-28°C в течение четырех недель.

Ксилемный сок из 4-недельных растений томата собирали, как описано Kohlen et al., *Plant Physiology*. 155(2):721-734, 2011. Вкратце, растения томата декапитировали над гипокотилем и вокруг стебля помещали пластмассовое кольцо. Накапливающийся ксилемный сок собирали в течение 90 мин. после декапитации. Ксилемный сок

фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм с удалением крупных частиц и РМР очищали, как описано в **примере 2**.

г) Выделение РМР из среды для культивирования клеток табака ВУ-2

Клетки табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L cv. Bright Yellow 2) культивировали в темноте при 26°C на шейкере при 180 об./мин. в MS-среде (Мурасиге-Скуга, 1962) для культивирования ВУ-2 (рН 5,8), содержащей соли MS (Duchefa, Харлем, Нидерланды, № M0221) с добавлением 30 г/л сахарозы, 2,0 мг/л дигидрофосфата калия, 0,1 г/л миоинозита, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты и 1 мг/л тиамина HCl. Клетки ВУ-2 еженедельно пересеивали путем переноса 5% (об./об.) 7-дневной культуры клеток в 100 мл свежей жидкой среды. Через 72-96 часов культуральную среду ВУ-2 собирали и центрифугировали при 300 g при 4°C в течение 10 минут для удаления клеток. Супернатант, содержащий РМР, собирали и очищали от остатков путем фильтрования на фильтре с размером пор 0,85 мкм. РМР очищали, как описано в **примере 2**.

Пример 2. Получение очищенных пакетов-мессенджеров растений (РМР)

В этом примере продемонстрировано получение очищенных РМР из фракций неочищенных РМР, описанных в **примере 1**, с применением ультрафильтрации в комбинации с эксклюзионной хроматографией, градиента плотности (йодиксанол или сахароза) и удаления агрегатов с помощью осаждения или эксклюзионной хроматографии.

Схема эксперимента

а) Получение очищенных РМР из грейпфрута с применением ультрафильтрации в комбинации с эксклюзионной хроматографией

Фракцию неочищенных РМР из грейпфрута из **примера 1а** концентрировали с применением центробежного фильтра Amicon с отсечением по молекулярной массе 100 кДа (MWCO) (Merck Millipore). Затем концентрированный раствор неочищенных РМР загружали в колонку для эксклюзионной хроматографии PURE-EV (HansaBioMed Life Sciences Ltd) и выделение осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные фракции, содержащие РМР, объединяли после элюирования. Необязательно РМР могли дополнительно концентрировать с применением центробежного фильтра Amicon MWCO 100 кДа или посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF). Очищенные РМР анализировали, как описано в **примере 3**.

б) Получение очищенных РМР из апопласта растения рода Arabidopsis с применением градиента йодиксанола

Неочищенные РМР из апопласта листьев растения рода *Arabidopsis* выделяли, как описано в **примере 1а**, и РМР очищали с использованием градиента йодиксанола, как описано в Rutter and Innes, *Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017. Для приготовления ступенчатых градиентов йодиксанола (OptiPrep; Sigma-Aldrich) получали растворы 40% (об./об.), 20% (об./об.), 10% (об./об.) и 5% (об./об.) йодиксанола путем разбавления 60% водного исходного раствора OptiPrep в буфере для выделения везикул (VIB; 20 mM MES, 2 mM CaCl₂ и 0,1 M NaCl, pH 6). Градиент образовывался путем наслоения 3 мл 40% раствора, 3 мл 20% раствора, 3 мл 10% раствора и 2 мл 5% раствора. Раствор

неочищенных РМР из апопласта из **примера 1а** центрифугировали при 40000 g в течение 60 мин. при 4°C. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл VIB и наслаивали поверх градиента. Центрифугирование проводили при 100000 g в течение 17 ч. при 4°C. Первые 4,5 мл в верхней части градиента удаляли, а затем собирали 3 объема по 0,7 мл, которые содержали РМР из апопласта, доводили их до 3,5 мл с помощью VIB и центрифугировали при 100000 g в течение 60 мин. при 4°C. Осадки промывали с помощью 3,5 мл VIB и повторно осаждали с применением тех же условий центрифугирования. Осадки очищенных РМР объединяли для последующего анализа, как описано в **примере 3**.

с) Получение очищенных РМР из грейпфрута с применением градиента сахарозы

Неочищенные РМР из грейпфрутового сока выделяли, как описано в **примере 1d**, центрифугировали при 150000 g в течение 90 мин., и осадок, содержащий РМР, ресуспендировали в 1 мл PBS, как описано (Mu et al., Molecular Nutrition & Food Research. 58(7):1561-1573, 2014). Ресуспендированный осадок переносили в ступенчатый градиент сахарозы (8%/15%/30%/45%/60%) и центрифугировали при 150000 g в течение 120 мин. с получением очищенных РМР. Очищенные РМР из грейпфрута собирали с поверхности раздела 30%/45% и затем анализировали, как описано в **примере 3**.

д) Удаление агрегатов из РМР из грейпфрута

Для удаления белковых агрегатов из полученных РМР из грейпфрута, как описано в **примере 1d**, или из очищенных РМР из **примера 2а-с**, могли включать дополнительную стадию очистки. Полученный раствор РМР пропускали через диапазон рН для осаждения агрегатов белка в растворе. рН доводили до 3, 5, 7, 9 или 11 путем добавления гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты. рН измеряли с применением калиброванного рН-зонда. Как только раствор достигал заданного значения рН, его отфильтровывали для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы раствор выделенных РМР можно флокулировать с применением добавления заряженных полимеров, таких как Polymin-P или Praestol 2640. Вкратце, на л раствора добавляли 2-5 г Polymin-P или Praestol 2640 и перемешивали лопастной мешалкой. Затем раствор отфильтровывали с удалением твердых частиц. В качестве альтернативы агрегаты солубилизировали путем повышения концентрации соли. NaCl добавляли к раствору РМР до достижения им концентрации 1 моль/л. Затем раствор фильтровали с очисткой РМР. В качестве альтернативы агрегаты солубилизировали путем повышения температуры. Смесь выделенных РМР нагревали при перемешивании до тех пор, пока раствор не достигал однородной температуры 50°C, в течение 5 минут. Затем смесь РМР отфильтровывали с выделением РМР. В качестве альтернативы растворимые контаминанты из растворов РМР отделяли с помощью эксклюзионной хроматографической колонки в соответствии со стандартными процедурами, где РМР элюировались в первых фракциях, в то время как белки, рибонуклеопротеины и некоторые липопротеины элюировались позже. Эффективность удаления агрегатов белка определяли путем измерения и сравнения концентрации белка до и после удаления агрегатов белка с помощью количественного определения белка с помощью ВСА/метода Бредфорда. Полученные РМР анализировали, как описано в

примере 3**Пример 3. Характеристика пакета-мессенджера растения**

В этом примере продемонстрировано определение характеристик РМР, полученных, как описано в **примере 1** или **примере 2**.

*Схема эксперимента*а) Определение концентрации РМР

Концентрацию частиц РМР определяли с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA) с применением Malvern NanoSight или с помощью настраиваемого резистивного импульсного датчика (TRPS) с применением iZon qNano в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию белка в очищенных РМР определяли с помощью анализа белка DC (Bio-Rad). Концентрацию липидов в очищенных РМР определяли с применением флуоресцентного липофильного красителя, такого как DiOC6 (ICN Biomedicals), как описано Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017. Вкратце, очищенные гранулы РМР из **примера 2** ресуспендировали в 100 мл 10 мМ DiOC6 (ICN Biomedicals), разбавленного буфером MES (20 мМ MES, pH 6) вместе с 1% коктейлем ингибиторов протеаз растений (Sigma-Aldrich) и 2 мМ 2,29-дипиридилдисульфида. Ресуспендированные РМР инкубировали при 37°C в течение 10 мин., промывали с помощью 3 мл буфера MES, повторно осаждали (40000 g, 60 мин., при 4°C) и ресуспендировали в свежем буфере MES. Интенсивность флуоресценции DiOC6 измеряли при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 535 нм.

б) Биофизическая и молекулярная характеристика РМР

РМР характеризовали с помощью электронной и криоэлектронной микроскопии на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 1010 в соответствии с протоколом из Wu et al., Analyst. 140(2):386-406, 2015. Размер и дзета-потенциал РМР также измеряли с помощью Zetasizer от Malvern или qNano от iZon, согласно инструкциям производителя. Липиды выделяли из РМР с применением экстракции хлороформом и характеризовали с помощью LC-MS/MS, как показано в Xiao et al. Plant Cell. 22(10): 3193-3205, 2010. Липиды, представляющие собой гликозилинозитолфосфорилцерамиды (GIPC) экстрагировали и очищали, как описано Casas et al., Plant Physiology. 170: 367-384, 2016, и анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано выше. Общую РНК, ДНК и белок характеризовали с применением наборов Quant-It от Thermo Fisher в соответствии с инструкциями. Белки РМР характеризовали с помощью LC-MS/MS в соответствии с протоколом в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017. РНК и ДНК экстрагировали с помощью Trizol, получали в виде библиотек с помощью TruSeq Total RNA с набором Ribo-Zero Plant и набором Nextera Mate Pair Library Prep Kit от Illumina, и секвенировали на MiSeq от Illumina в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 4. Характеристика стабильности пакета-мессенджера растений

В этом примере продемонстрировано измерение уровня стабильности РМР в широком диапазоне условий хранения и физиологических условий.

Схема эксперимента

РМР, полученные, как описано в **примерах 1 и 2**, подвергали воздействию различных условий. РМР суспендировали в воде, 5% сахарозе или PBS и оставляли на 1, 7, 30 и 180 дней при -20°C , 4°C , 20°C и 37°C . РМР также суспендировали в воде и высушивали с помощью роторного испарителя и оставляли на 1, 7, 30 и 180 дней при 4°C , 20°C и 37°C . РМР также суспендировали в воде или 5% растворе сахарозы, быстро замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Через 1, 7, 30 и 180 дней высушенные и лиофилизированные РМР ресуспендировали в воде. Предыдущие три эксперимента с условиями при температурах выше 0°C также проводили при воздействии имитатора искусственного солнечного света, чтобы определить стабильность состава в условиях, моделирующих УФ-излучение вне помещения. РМР также подвергали воздействию температур 37°C , 40°C , 45°C , 50°C и 55°C в течение 1, 6 и 24 часов в буферных растворах с pH 1, 3, 5, 7 и 9 с добавлением или без добавления 1 единицы трипсина или других искусственных желудочных жидкостей.

После каждой из этих обработок РМР возвращали к температуре 20°C , нейтрализовали до pH 7,4 и характеризовали с применением некоторых или всех способов, описанных в **примере 3**.

Пример 5. Обработка гриба пакетами-мессенджерами растений

Данный пример демонстрирует способность РМР, полученных из розеток растения *Arabidopsis thaliana*, снижать приспособленность патогенного гриба. В данном примере дрожжевой гриб *Saccharomyces cerevisiae* является моделью патогенного гриба.

Патогенные грибы, такие как виды *Candida*, представляют собой основную причину оппортунистических грибковых инфекций во всем мире, *Saccharomyces cerevisiae* (также известный как "пекарские дрожжи") в основном считается симбионтом в пищеварительной системе. Однако с 1990-х годов появляется все больше сообщений о его роли в качестве этиологического фактора инвазивной инфекции. Инфекции, вызываемые патогенными грибами, обычно ассоциированы с высокой заболеваемостью и смертностью, в основном в связи с ограниченной эффективностью существующих противогрибковых препаратов.

Схема обработки

Раствор РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis* составляли с использованием 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг белка РМР/мл из **примера 1а** в 10 мл PBS.

Схема эксперимента

а) Мечение РМР из апопласта липофильным красителем для мембран

РМР из апопласта *Arabidopsis thaliana* выделяли и очищали, как описано в **примерах 1-2**, и метили с помощью РКН26 (Sigma) в соответствии с протоколом производителя, с некоторыми модификациями. Вкратце, 50 мг РМР из апопласта в 1 мл разбавленного С или набора РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Мечение останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь не присоединенный в виде метки краситель смывали путем центрифугирования при 150000 g

в течение 90 мин., и осадки меченого РМР ресуспендировали в стерильной воде.

b) Захват РМР из апопласта *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали при 30°C в пептонно-декстрозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Для определения захвата РМР *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селекционной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг/мл РКН26-мечеными РМР, полученными из апопласта, непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к контролю, представляющему собой PBS, клетки *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл). После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Полученные из апопласта РМР захватывались дрожжевыми клетками, в случае если красные РМР наблюдались в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Для оценки захвата РМР процент дрожжевых клеток с красной цитоплазмой/красными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26.

c) Обработка *S. cerevisiae* раствором РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis in vitro*

Для определения эффекта обработки РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis* в отношении приспособленности дрожжевых клеток проводили модифицированный тест на лекарственную чувствительность. Клетки *S. cerevisiae* (10⁵ клеток/мл) смешивали с расплавленным агаром YPD (примерно 40°C) и выливали в чашку Петри. После затвердевания агара на планшет наносили 5 мкл раствора, содержащего 0 (PBS, отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг белка РМР/мл. Планшеты инкубировали при 30°C, а зоны ингибирования (темные круги) оценивали через 2 и 3 дня.

Дополнительно проводили анализ методом пятна для оценки эффекта РМР в отношении роста дрожжевых грибов. Клетки *S. cerevisiae* выращивали в течение ночи на среде YPD. Затем клетки суспендировали в физиологическом растворе до получения OD₆₀₀ 0,1 (A₆₀₀). Пять микролитров пятикратных серийных разбавлений каждой дрожжевой культуры наносили на планшеты с YPD в отсутствие (контроль PBS) и в присутствии 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл. Различия в росте регистрировали после инкубации планшетов в течение 48 ч. при 30°C.

Общий эффект РМР из апопласта растения *Arabidopsis* на приспособленность грибов определяли путем сравнения зон ингибирования и различий в росте между контрольными обработанными PBS и обработанными РМР клетками грибов.

Пример 6. Обработка бактерии пакетами-мессенджерами растений

Данный пример демонстрирует способность очищенных РМР из апопласта розеток растения *Arabidopsis thaliana* захватываться бактериями и снижать приспособленность

патогенной бактерии *Escherichia coli*. В данном примере *E. coli* использовали в качестве модели бактериального патогена.

Заболевания человека и животных, вызываемые бактериальными патогенами, такими как *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* и *E. coli*, характеризуются значительной заболеваемостью и смертностью в связи с ограниченной эффективностью и повышением устойчивости к современным противомикробным препаратам.

Схема обработки

Раствор РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis* составляли с 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл в 10 мл стерильной воды.

а) Мечение РМР из апопласта липофильным красителем для мембран

РМР из апопласта *Arabidopsis thaliana* получали, как описано в **примерах 1-2**, и метили с помощью РКН26 (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми модификациями. Вкратце, 50 мг РМР разбавляли в 1 мл разбавленного С, смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Мечение останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь не присоединенный в виде метки краситель смывали путем центрифугирования при 150000 g в течение 90 мин., и меченые осадки РМР ресуспендировали в стерильной воде, и анализировали, как описано в **примере 3**.

*б) Захват РМР из апопласта бактерией *E. coli**

E. coli получали из ATCC (№ 25922) и выращивали на триптиказо-соевом агаре/бульоне при 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Для определения уровня захвата РМР *E. coli* 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали непосредственно с 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг/мл РКН26-меченых РМР из апопласта на предметных стеклах. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *E. coli* инкубировали в присутствии красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл). После инкубации в течение 5 мин, 30 мин и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. РМР из апопласта захвачены бактериями, если цитоплазма бактерий становится красной по сравнению с таковой при окрашивании клеточной мембраны исключительно красителем РКН26. Регистрировали процент бактерий, обработанных с помощью РКН26-РМР, с красной цитоплазмой по сравнению с контрольными обработками с помощью только PBS и красителя РКН26, для определения уровня захвата РМР.

*в) Обработка *E. coli* раствором РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis in vitro**

Способность РМР апопласта растения рода *Arabidopsis* влиять на рост *E. coli* определяли с использованием модифицированного стандартного дискового диффузионного способа для определения чувствительности. Вкратце, суспензию инокулята *E. coli* получали путем отбора нескольких морфологически схожих колоний, полученных в результате выращивания в течение ночи (16-24 ч. инкубации) на

неселективной среде, с помощью стерильной петли или ватного тампона и суспендирования колоний в стерильном растворе хлорида натрия (0,85% NaCl вес/об. в воде) до плотности стандарта МакФарланда 0,5, что приблизительно соответствует $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл. Чашки с агаром Мюллера-Хинтона (диаметром 150 мм) инокулировали суспензией *E. coli*, погружая стерильный ватный тампон в суспензию посевного материала, удаляя излишки жидкости с тампона и равномерно распределяя бактерии по всей поверхности чашки с агаром мазками в трех направлениях. Затем на чашку наносили 3 мкл воды (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл и давали высохнуть. Чашки инкубировали в течение 16-18 часов при 35°C, фотографировали и сканировали. Измеряли диаметр литической зоны (области без бактерий) вокруг области, на которую наносили РМР. Литические зоны, полученные при обработке контролем (водой) и РМР, сравнивали для определения бактерицидного эффекта РМР из апопласта растения рода *Arabidopsis*.

Пример 7. Обработка паразитического насекомого с помощью РМР

В данном примере продемонстрирована способность уничтожать паразитических насекомых, таких как постельные клопы, или снижать их приспособленность путем обработки их раствором РМР, полученных из растения, такого как корни имбиря. В данном примере постельных клопов использовали в качестве модельного организма для паразитических насекомых.

Постельные клопы (*Cimex lectularius*) представляют собой гематофагов-эктопаразитов, которые являются важным появляющимся вредителем общественного здоровья во всем мире. Отсутствие эффективных инсектицидов остаточного действия и более высокая устойчивость к пиретроидным инсектицидам у популяций постельных клопов требуют разработки эффективных и экологически безопасных способов борьбы.

Схема обработки

Раствор РМР из корня имбиря составляли из расчета 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 и 250 мкг белка РМР/мл в 10 мл PBS.

Схема эксперимента

а) Выращивание постельных клопов (Cimex lectularius)

Cimex lectularius получали из Sierra Research Laboratories (Модесто, Калифорния, США). Колонии постельных клопов содержали в стеклянных садках с картонными укрытиями и поддерживали в фотопериоде 12:12 при 25°C и 40-45% (окружающей) влажности. Колонии кормили кровью один раз в неделю с помощью параплазменно-мембранной кормушки, содержащей дефибринированную кровь кролика (Hemostat Laboratories, Диксон, Калифорния, США).

б) Обработка Cimex lectularius раствором РМР из корня имбиря

РМР из корня имбиря выделяли, как описано в **примере 1**, и определяли эффект обработки РМР в отношении выживаемости, плодовитости и развития постельных клопов. Перед обработкой взрослых постельных клопов в возрасте 0-2 недель, которые не питались кровью в течение четырех дней, изолировали и помещали в стеклянные сосуды

для обеспечения возможности спаривания в течение двух дней. Самцов отделяли, а самок постельных клопов разделяли на экспериментальные когорты по 10-15 насекомых, которых содержали вместе. Самок постельных клопов обрабатывали, давая им возможность питаться дефибринированной кровью кролика с добавлением раствора РМР в конечной концентрации 0 (PBS, отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл в течение 15 мин. до полного насыщения. После обработки РМР когорты по 10-15 постельных клопов содержали при 25°C и 40-45% (окружающей) влажности в чашке Петри, содержащей стерильную подушку, которая обеспечивала подходящий субстрат для откладки яиц (Advantec MFS, Inc., Дублин, Калифорния, США). Для анализов выживаемости мертвых насекомых подсчитывали, регистрировали и удаляли из садка каждый день в течение 10 дней, и рассчитывали средний процент выживаемости постельных клопов, обработанных РМР, по сравнению с контрольными обработанными PBS клопами.

После этого постельных клопов каждые 10 дней кормили кровью с добавлением РМР, как указано выше, и переносили в новую чашку Петри. Чашки Петри с яйцами выдерживали в камере для выращивания в течение 2 недель для обеспечения достаточного времени для вылупления. Отложенные яйца наблюдали под стереомикроскопом с увеличением в 16 раз, и среднее количество яиц, отложенных самками постельных клопов за интервал питания, рассчитывали за 30 дней, оценивали среднее количество личинок, которые выходили из яиц, и рассчитывали средний процент выживаемости клопов. Эффект РМР из корня имбиря в отношении выживаемости, плодовитости и развития постельных клопов определяли путем сравнения когорт, получавших РМР из корня имбиря, с контрольными когортами, получавшими PBS.

Пример 8. Обработка паразитической нематоды с помощью РМР

В данном примере продемонстрирована способность уничтожать паразитических нематод, таких как *Heligmosomoides polygyrus*, или снижать их приспособленность путем обработки их раствором РМР, полученных из растения, такого как корни имбиря.

Хронические гельминтозы остаются огромной проблемой глобального здравоохранения, вызывая повышенную заболеваемость как у людей, так и у животных, относящихся к домашнему скоту. Многие из наиболее распространенных паразитов-гельминтов трудно изучать в лаборатории, поскольку они эволюционировали совместно с видами своих окончательных хозяев и хорошо адаптированы к ним. В данном примере мы использовали модельный патогенный гельминт *H. polygyrus*, естественный паразит мышей, для демонстрации эффекта РМР из корня имбиря в отношении его приспособленности.

Схема обработки

Раствор РМР из корня имбиря составляли из расчета 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл из **примера 1а** в 10 мл стерильной воды.

Схема эксперимента

а) Выращивание паразитической нематоды *Heligmosomoides polygyrus*

Выращивание *H. polygyrus* проводили, как описано в Keiser et al., Parasites & Vectors. 9(1):376, 2016. Четырехнедельных самок мышей NMRI и *H. polygyrus* L3 приобретали у местного поставщика. Самок мышей NMRI инфицировали 80 нематодами *H. polygyrus* L3 per os. Яйца *H. polygyrus* получали из инфицированных фекалий.

b) Обработка яиц *H. polygyrus* раствором РМР из корня имбиря in vitro

Для оценки нематоцидной активности раствора РМР из корня имбиря при вылуплении из яиц яйца *H. polygyrus* получали из инфицированных фекалий мыши, очищали и замачивали в растворе, содержащем 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл РМР из корня имбиря в течение 30 мин., 1 часа или 2 часов. Затем яйца помещали на агар на 14 дней в темноте при 24°C, и начиная с 6 дней регистрировали количество вылупившихся личинок L3. Эффект РМР из корня имбиря в отношении вылупления из яиц определяли путем сравнения процента вылупившихся яиц *H. polygyrus* с обработкой РМР и без нее.

c) Обработка личинок *H. polygyrus* L3 раствором РМР из корня имбиря in vitro

Для оценки нематоцидной активности раствора РМР в отношении личинок *H. polygyrus* L3, яйца *H. polygyrus* получали из инфицированных фекалий, помещали на агар, где через 9 дней в темноте при 24°C вылуплялись личинки L3. Для обработки РМР 40 личинок L3 помещали в каждую лунку 96-луночного планшета. Червей инкубировали в присутствии 100 мкл среды RPMI 1640 с добавлением 0,63 мкг/мл амфотерицина В, 500 Ед./мл пенициллина, 500 мкг/мл стрептомицина и 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл. Каждую обработку тестировали в двух повторностях. Черви, инкубированные в присутствии 100 мкМ левамизола (Sigma-Aldrich), служили в качестве положительного контроля. Планшеты выдерживали при комнатной температуре не более 72 ч. Для оценки эффекта обработки РМР в отношении приспособленности L3 подсчитывали общее количество личинок L3 на лунку и регистрировали движущиеся личинки после стимуляции 100 мкл горячей воды ($\approx 80^\circ\text{C}$). Относительный процент движущихся личинок L3 сравнивали между РМР-обработкой и положительным и отрицательным контролями для определения нематоцидного эффекта РМР из корня имбиря в отношении личинок.

d) Обработка взрослых особей *H. polygyrus* раствором РМР из корня имбиря in vitro

Самок мышей NMRI заражали 80 нематодами *H. polygyrus* L3 per os. Через две недели после инфицирования мышей препарировали и помещали по три взрослых червя в каждую лунку 24-луночного планшета. Червей инкубировали со средой для культивирования и 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР из корня имбиря/мл. Каждую обработку тестировали в трех повторностях. Взрослые черви, инкубированные только со средой и 50 мкМ левамизола, служили в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Червей содержали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч., а затем их оценивали под микроскопом с использованием шкалы жизнеспособности от 3 (активный) до 0 (неподвижный). Средние показатели жизнеспособности взрослых особей *H. polygyrus* сравнивали между РМР-

обработанными червями и положительным и отрицательным контролями для определения нематоцидного эффекта РМР из корня имбиря в отношении взрослых особей.

е) Обработка *N. polygyrus* in vivo раствором РМР из корня имбиря у мышей.

Для проверки нематоцидного эффекта обработки РМР из корня имбиря in vivo, мышей NMRI заражали 80 нематодами *N. polygyrus* L3 per os. Через четырнадцать дней после инфицирования мышам перорально вводили тестируемые лекарственные средства в дозах 10, 100, 300 или 400 мг белка РМР/кг или контрольный левамизол. От четырех до шести необработанных мышей служили в качестве контроля. Через десять дней после обработки животных умерщвляли способом с использованием CO₂ и изымали желудочно-кишечный тракт. Кишечник рассекали, собирали и подсчитывали взрослых червей. Нематоцидную активность РМР из корня имбиря, вводимых перорально, определяли путем сравнения среднего количества взрослых червей в когортах мышей, получавших РМР, с когортами мышей, получавшими отрицательный и положительный контроли.

Пример 9. Обработка паразитического простейшего с помощью РМР

В данном примере продемонстрирована способность уничтожать паразитических простейших, таких как *Trichomonas vaginalis*, или снижать их приспособленность путем обработки их раствором РМР, полученных из растения, такого как корни имбиря. В данном примере *T. vaginalis* использовали в качестве модельного паразитического простейшего.

Trichomonas vaginalis вызывает одно из самых распространенных невирусных заболеваний, передающихся половым путем (STD), во всем мире. Это анаэробное простейшее, передвигающееся посредством передних жгутиков и волнообразной мембраны, заражает около 180 миллионов женщин во всем мире, при этом, по самым скромным оценкам, ежегодно в Соединенных Штатах заражаются 6 миллионов. В связи с повышенной устойчивостью паразита к классическим лекарственным средствам семейства метронидазолов возрастает потребность в новых неродственных средствах.

Схема обработки

Раствор РМР из корня имбиря составляли из расчета 0 (отрицательный контроль), 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл в 10 мл стерильной воды.

Схема эксперимента

а) Культивирование паразитических простейших *T. vaginalis*

Trichomonas vaginalis получали из ATCC (№ 50167) и культивировали в соответствии с инструкциями производителя и как описано в Tiwari et al., Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62(3): 526-534, 2008. Простейших выращивали в стандартной среде TYI-S33 (рН 6,8) с добавлением 10% FCS, смеси витаминов и 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина при 37°C в 15 мл стеклянных пробирках с завинчивающейся пробкой. Культуры обычно достигали концентрации 2×10^7 клеток/мл за 48 ч. Для поддержания культуры использовали посевной материал в количестве 1×10^4 клеток на пробирку.

б) Обработка *T. vaginalis* раствором РМР из корня имбиря

РМР из корня имбиря получали, как описано в **примере 1**. Для определения эффекта РМР из корня имбиря в отношении приспособленности *T. vaginalis* проводили анализ лекарственной чувствительности, как описано ранее (Tiwarti et al., Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62(3): 526-534, 2008). Вкратце, 5×10^3 трофозоитов *Trichomonas* на мл инкубировали в присутствии 0 (стерильная вода, отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг белка РМР/мл или 1-12 мМ метронидазола (Sigma-Aldrich) в качестве положительного контроля в среде для культивирования TYI-S33 в 24-луночных культуральных планшетах при 37°C. Клетки проверяли на жизнеспособность через различные промежутки времени от 3 ч. до 48 ч. под микроскопом при 20х увеличении. Жизнеспособность клеток *T. vaginalis* определяли с помощью анализа вытеснения трипанового синего. Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра. Минимальная концентрация раствора РМР, при которой все клетки оказывались мертвыми, считалась его минимальной ингибирующей концентрацией (МИС). Эксперимент повторяли три раза для подтверждения МИС. Эффект РМР из корня имбиря в отношении приспособленности *T. vaginalis* определяли путем сравнения средних значений МИС для обработанных РМР клеток с таковыми для отрицательного и положительного контролей.

Пример 10. Обработка гриба пакетами-мессенджерами растений, загруженными короткой нуклеиновой кислотой

В данном примере продемонстрирована способность РМР доставлять короткую нуклеиновую кислоту путем выделения липидов РМР и их синтеза в везикулы, содержащие короткие нуклеиновые кислоты. В данном примере РМР, загруженные короткими двухцепочечными РНК (dsRNA), использовали для обеспечения нокдауна фактора вирулентности у патогенного гриба *Candida albicans*. Это также демонстрирует, что РМР, загруженные короткой нуклеиновой кислотой, являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды. В данном примере dsRNA использовали в качестве модельной нуклеиновой кислоты, а *Candida albicans* использовали в качестве модельного патогенного гриба.

Виды *Candida* представляют собой основную причину оппортунистических грибковых инфекций во всем мире, а *Candida albicans* остается наиболее распространенным этиологическим фактором кандидоза, занимающего в настоящее время третье-четвертое место среди наиболее распространенных внутрибольничных инфекций. Эти инфекции обычно ассоциированы с высокой заболеваемостью и смертностью, в основном в связи с ограниченной эффективностью существующих противогрибковых лекарственных средств. У *C. albicans* морфогенетические превращения между дрожжевой и мицелиальной формами и образование биопленки представляют собой два важных биологических процесса, которые тесно ассоциированы с биологией этого гриба, а также играют важную роль в патогенезе кандидоза.

Терапевтическая доза

РМР, загруженные dsRNA, составляли в воде до концентрации, которая

обеспечивала эквивалент эффективной дозы siRNA, составляющей 0, 50, 500 или 1000 нМ, в стерильной воде.

Протокол эксперимента

а) Синтез РМР из грейпфрута, загруженных dsRNA EFG1, из выделенных липидов РМР из грейпфрута

Короткие нуклеиновые кислоты загружали в РМР в соответствии с модифицированным протоколом из Wang et al, Nature Comm., 4:1867, 2013. Вкратце, очищенные РМР получали из грейпфрута в соответствии с **примером 1-2**, и липиды РМР из грейпфрута выделяли адаптированным способом из Xiao et al. Plant Cell. 22(10): 3193-3205, 2010. Вкратце, 3,75 мл 2:1 (об./об.) MeOH:CHCl₃ добавляли к 1 мл РМР в PBS и встряхивали на вортексе. Последовательно добавляли CHCl₃ (1,25 мл) и ddH₂O (1,25 мл) и встряхивали на вортексе. Затем смесь центрифугировали при 2000 об./мин. в течение 10 мин. при 22°C в стеклянных пробирках для разделения смеси на две фазы (водную фазу и органическую фазу). Для сбора органической фазы стеклянную пипетку вставляли через водную фазу с небольшим положительным давлением, и нижнюю фазу (органическую фазу) аспирировали и распределяли в новые стеклянные пробирки. Образцы органической фазы разделяли на аликвоты и высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм).

Короткую двухцепочечную РНК (dsRNA), целенаправленно воздействующую на siRNA EFG1 у *Candida albicans*, с антисмысловой последовательностью: 5'ACAUUGAGCAAUUUGGUUC-3' и смысловой последовательностью: 5'-GAACCAAUUGCUCUCAAUGU-3', и контрольную скремблированную siRNA 5'-AUAUGCGCAACAUGACA-3', как указано в Moazeni et al., *Mycopathologia*. 174(3):177-185, 2012, получали из IDT. Смысловой/антисмысловой отжиг проводили в буфере для отжига (30 mM HEPES-KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ и 50 mM NH₄ Ac, как описано в (Moazeni et al., *Mycopathologia*. 174(3):177-185, 2012) с образованием дуплекса siRNA (dsRNA). РМР, загруженные dsRNA, синтезировали как из целевой, так и из контрольной siRNA путем смешивания липидов и коротких нуклеиновых кислот, которые высушивали с образованием тонкой пленки. Пленку диспергировали в PBS и обрабатывали ультразвуком с образованием загруженных липосомальных композиций. РМР очищали с применением градиента сахарозы, как описано в **примере 2**, и промывали путем ультрацентрифугирования для удаления несвязанной нуклеиновой кислоты перед использованием. Небольшую часть обоих образцов характеризовали с применением способов, описанных в **примере 3**, содержание РНК измеряли с применением набора для анализа РНК Quant-It RiboGreen, а их стабильность тестировали, как описано в **примере 4**.

Для определения эффективности блокирования грибов с применением РМР, загруженных siRNA, из **примера 10а**, грибы *Candida albicans* обрабатывали раствором РМР с эффективной дозой siRNA, составляющей 0, 50, 500 и 1000 нМ в стерильной воде. Штамм *C. albicans* дикого типа (ATCC № 14053) культивировали в чашках со средой пептон/декстроза с дрожжевым экстрактом (YPD), инкубировали при 37°C в течение 24

часов и поддерживали при 4°C до использования. Эффект и эффективность обработки с помощью РМР, загруженных dsRNA EFG1, сравнивали со скремблированным и отрицательным контролями.

б) Обработка *Candida albicans* с помощью РМР из грейпфрута, загруженных siRNA EFG1, для уменьшения грибковой биопленки

Для измерения эффекта РМР, загруженных siRNA, в отношении образования биопленки *C. albicans* ночную культуру *C. albicans* выращивали путем инокуляции в 20 мл жидкой среды дрожжевой пептон-декстрозы (YPD) (1% [вес/об.] дрожжевого экстракта, 2% [вес/об.] пептона, 2% [вес/об.] декстрозы) в колбах объемом 150 мл и инкубировали в орбитальном шейкере (150-180 об./мин.) при 30°C. В таких условиях *C. albicans* растет в виде почкующихся дрожжей. Биопленки формировали с использованием модели 96-луночного микротитрационного планшета, описанной в Pierce et al., Pathog Dis. Apr; 70(3): 423-431, 2014. Вкратце, клетки собирали из ночных культур YPD и после промываний ресуспендировали их в RPMI-1640 с добавлением L-глутамин (Cellgro) и забуферивали с использованием 165 мМ морфолинпропансульфоновой кислоты (MOPS) до конечной концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Биопленки *C. albicans* biofilms образовывались на коммерчески доступных предварительно стерилизованных, полистирольных плоских 96-луночных микротитрационных планшетах (Corning Incorporated, Корнинг, Нью-Йорк, США). На лунку распределяли 250 мкл $1,0 \times 10^6$ клеток/мл *C. albicans* и добавляли РМР, загруженные siRNA EFG1, или скремблированный контроль до конечной концентрации 0 (вода, отрицательный контроль), 50, 500 или 1000 нМ. Обработки проводили в трех повторностях и планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После образования биопленки лунки дважды промывали для удаления неадгезивных клеток, визуализировали с помощью световой микроскопии и обрабатывали с помощью полуколичественного колориметрического анализа, основанного на восстановлении 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамидида (ХТТ, Sigma). OD образующихся контрольных биопленок (в отсутствие РМР) произвольно устанавливали на 100% и ингибирующие эффекты РМР, загруженных siRNA, определяли по процентному снижению абсорбции по сравнению с контролями. Данные рассчитывали как процент ингибирования биопленки относительно среднего значения для контрольных лунок.

Для количественной оценки изменений в экспрессии EFG1 измеряли уровень mRNA EFG1 в *C. albicans* с помощью количественной RT-PCR в режиме реального времени. Общую РНК подвергали экстракции с использованием набора для очистки общей РНК растений/грибов Fisher BioReagents™ SurePrep™ (Fisher scientific, Уолтем, Массачусетс, США), синтезу cDNA с использованием обратной транскриптазы SuperScript III (Invitrogen Карлсбад, Калифорния, США) и количественному определению с помощью количественной RT-PCR. Экспрессию EFG1 (XM_709104.1) и конститутивного гена бета-актина ACT1 (XM_717232.1) определяли у *C. albicans* после обработки синтезированной dsRNA EFG1, а скремблированный контроль измеряли с

использованием следующих праймеров: EFG1-прямой: TGCCAATAATGTGTCGGTTG, EFG1-обратный: CCCATCTCTTCTACCACGTGTC, АСТ1-прямой: ACGGTATTGTTTCCAACCTGGGACG, АСТ1-обратный: TGGAGCTTCGGTCAACAAAACCTGG (Moazeni et al., *Mycopathologia*. 174(3):177-185, 2012). RT-qPCR выполняли с использованием SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) с тремя техническими повторами в соответствии со следующим протоколом: денатурация при 95°C в течение 3 мин, 40 повторов при 95°C в течение 20 с, 61°C в течение 20 с и 72°C в течение 15 с.

Содержание EFG1 нормировали по отношению к содержанию АСТ1 в продукте ПЦР, полученном из растений, для определения эффективности нокдауна, которую определяли путем вычисления значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормированный рост грибов в образцах отрицательного контроля с PBS с нормированным ростом грибов в образцах обработанных РМР, загруженных ds-RNA.

с) Обработка *Candida albicans* с помощью РМР из грейпфрута, загруженных siRNA EFG1, для снижения приспособленности грибов

Для оценки эффекта РМР, загруженных siRNA EFG1, в отношении роста грибов, проводили анализ активности РМР с использованием дрожжей, погруженных в агар, как описано Beaumont et al., *Cell Death and Disease*. 4(5): e619, 2013. Ночные культуры трансформантов в минимальной среде, содержащей глюкозу (2%, вес/об.), дважды промывали в 10 mM Трис-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (TE), затем ресуспендировали в TE. Измеряли OD600 и использовали для введения 5×10^7 колониеобразующих единиц дрожжей в 7,5 мл минимальной среды, содержащей галактозу, которую отстаивали до 37°C. Каждую дрожжевую суспензию смешивали с 7,5 мл минимальной агаровой среды, содержащей галактозу (2%, вес/об.), которую предварительно отстаивали до 50°C, быстро перемешивали путем переворачивания, затем выливали на предварительно приготовленные 10 см чашки, содержащие 15 мл минимальной агаровой среды, которая содержала галактозу. Чашки оставляли при комнатной температуре в течение часа. Пять микролитров РМР, загруженных siRNA EFG1 или скремблированным контролем, с концентрацией 0 (вода, отрицательный контроль), 50, 500 или 1000 нМ наносили пипеткой на планшеты, содержащие погруженные дрожжи, обеспечивали возможность высыхания при комнатной температуре, инкубировали при 30°C в течение 3 дней, затем фотографировали. Темные круги показывали подавление роста дрожжей, опосредованное РМР.

Пример 11. Обработка насекомого РМР, загруженными пептидной нуклеиновой кислотой

В данном примере показана загрузка РМР конструкцией пептидной нуклеиновой кислоты с целью снижения приспособленности насекомых с помощью нокдауна vATPase-E у постельных клопов (*Cimex lectularius*), что, как было продемонстрировано с помощью siRNA, оказывало отрицательный эффект в отношении выживаемости и размножения (Basnet and Kamble, *Journal of Medical Entomology*, 55(3): 540-546. 2018). Этот пример

также демонстрирует, что РМР, загруженные РНА, являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды. В данном примере РНА использовали в качестве модельного белка, а *Cimex lectularius* использовали в качестве модельного патогенного насекомого.

Терапевтическая доза

РМР, загруженные РНА, составляли в воде до концентрации, которая обеспечивала эквивалент эффективной дозы РНА, составляющей 0, 0,1, 1, 5 или 10 мкМ, в стерильной воде.

Протокол эксперимента

а) Загрузка РМР из грейпфрута пептидной нуклеиновой кислотой

РНА против ν ATPase-E *Cimex lectularius* (номер доступа в NCBI GenBank LOC106667865) разработаны и синтезированы соответствующим поставщиком. РМР из грейпфрута выделяли в соответствии с **примером 1**. РМР помещали в раствор с РНА в PBS. Затем раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в РМР в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 4:1867, 2013. В качестве альтернативы раствор могли пропускать через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al., J Contr. Rel., 207: 18-30, 2015. В качестве альтернативы их могли подвергать электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 40(17):e130, 2012. Через 1 час РМР очищали с применением градиента сахарозы и промывали путем ультрацентрифугирования, как описано в **примере 2**, для удаления несвязанной нуклеиновой кислоты перед использованием.

Размер, дзета-потенциал и количество частиц измеряли с помощью способов из **примера 3**, а их стабильность тестировали, как описано в **примере 4**. РНА в РМР количественно определяли с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности в соответствии с протоколом в Nikraves et al, Mol. Ther., 15(8): 1537-1542, 2007. Вкратце, ДНК, антисмысловую к РНА, смешивали с РНА-РМР, обработанными детергентом, с высвобождением РНА. Комплексы РНА-ДНК прогоняли на геле и визуализировали с помощью красителя для ssDNA. Затем осуществляли количественное определение дуплексов с помощью флуоресцентной визуализации. Загруженные и незагруженные РМР сравнивали для определения эффективности загрузки.

б) Обработка *Cimex lectularius* с помощью РМР из грейпфрута, загруженных РНА к ν ATPase-E, для снижения приспособленности насекомых

РМР, загруженные указанными выше РНА к ν ATPase-E, и контроль, представляющий собой скремблированную РНА, загружали в РМР в соответствии с описанным выше способом. *Cimex lectularius* получали из Sierra Research Laboratories (Модесто, Калифорния, США). Колонии постельных клопов содержали в стеклянных садках с картонными укрытиями и поддерживали в фотопериоде 12:12 при 25°C и 40-45% (окружающей) влажности. Колонии кормили кровью один раз в неделю с помощью параплеочно-мембранной кормушки, содержащей дефибринированную кровь кролика

(Hemostat Laboratories, Диксон, Калифорния, США).

Перед обработками с помощью РМР, загруженных РНА, взрослых особей в возрасте 0-2 недель, которые не питались кровью в течение четырех дней, изолировали и помещали в стеклянные сосуды для обеспечения возможности спаривания в течение двух дней. Самцов отделяли, а самок постельных клопов разделяли на экспериментальные когорты по 10-15 насекомых, которых содержали вместе. Самок постельных клопов обрабатывали, давая им возможность питаться дефибринированной кровью кролика с добавлением раствора РМР, загруженных РНА к *vATPase-E*, в конечной концентрации 0, 0,1, 1, 5 или 10 мкМ или раствора РМР, загруженных скремблированной РНА, в конечной концентрации 0, 0,1, 1, 5 или 10 мкМ в течение 15 мин. до полного насыщения. Постельные клопы, которых кормили дефибринированной кровью кролика, служили только в качестве контроля для экспериментов по кормлению. После обработки с помощью РМР, загруженных РНА, когорты по 10-15 постельных клопов содержали при 25°C и 40-45% влажности (окружающей среды) в чашке Петри, содержащей стерильную подушечку, которая обеспечивала подходящий субстрат для откладки яиц (Advantec MFS, Inc., Дублин, Калифорния, США). Для анализов выживаемости мертвых насекомых подсчитывали, регистрировали и удаляли из садка каждый день в течение 10 дней, и рассчитывали средний процент выживаемости постельных клопов, обработанных РМР, загруженными РНА к *vATPase-E*, по сравнению с контролями, обработанными РМР, загруженными скремблированной РНА, и водой.

После этого постельных клопов каждые 10 дней кормили кровью с добавлением РМР, загруженных РНА, и переносили в новую чашку Петри. Чашки Петри с яйцами выдерживали в камере для выращивания в течение 2 недель для обеспечения достаточного времени для вылупления. Отложенные яйца наблюдали под стереомикроскопом с увеличением в 16 раз, и среднее количество яиц, отложенных самками постельных клопов за интервал питания, рассчитывали за 30 дней, оценивали среднее количество личинок, которые выходили из яиц, и рассчитывали средний процент выживаемости клопов. Эффект РМР из корня имбиря в отношении выживаемости, плодовитости и развития постельных клопов определяли путем сравнения когорт, получавших РМР, загруженные РНА к *vATPase-E*, с контрольными когортами, получавшими РМР, загруженные скремблированной РНА, и получавшими PBS.

В день 3 и 30 после обработки, трех постельных клопов из каждого варианта обработки быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для оценки нокдауна mRNA *vATPase-E*, обеспеченного РНА, с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени, RT-qPCR. Общую РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen), а cDNA синтезировали с использованием обратной транскриптазы SuperScript III (Invitrogen Карлсбад, Калифорния, США). RT-qPCR выполняли с использованием SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad), используя ранее описанные праймеры: *v-ATPase-E*-прямой: AGGTCGCCTTGTCCAAAAC, *v-ATPase-E*-обратный: GCTTTTAGTCTCGCCTGGTTC, и конститутивного гена, *rpL8*-

прямой: AGGCACGGTTACATCAAAGG, rpL8- обратный: TCGGGAGCAATGAAGAGTTC (Basnet and Kamble, Journal of Medical Entomology, 55(3): 540-546. 2018). Содержание v-ATPase-E нормировали по отношению к содержанию рибосомного белка L8 и относительную эффективность нокдауна v-ATPase-E определяли путем вычисления значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормированную экспрессию v-ATPase-E в образцах, обработанных РМР, загруженных РНА к v-ATPase-E, с таковой в образцах, обработанных РМР, загруженных скремблированной РНА.

Пример 12. Обработка бактерии с помощью РМР, загруженных низкомолекулярным соединением

В данном примере продемонстрированы способы загрузки РМР низкомолекулярными соединениями, в данном варианте осуществления стрептомицином, с целью обеспечения снижения приспособленности *E. coli*. Это также демонстрирует, что РМР, загруженные низкомолекулярным соединением, являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды. В данном примере стрептомицин использовали в качестве модельного низкомолекулярного соединения, а *E. coli* использовали в качестве модельной патогенной бактерии.

Терапевтическая доза

РМР, загруженные низкомолекулярным соединением, составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы стрептомицина сульфата, составляющей 0, 2,5, 10, 50, 100 и 200 мг/мл.

а) Загрузка РМР из грейпфрута стрептомицином

РМР, полученные, как описано выше, помещали в раствор PBS с солюбилизированным стрептомицином. Раствор оставляли на 1 час при 22°C в соответствии с протоколом в Sun et al., Mol Ther. Sep;18(9):1606-14, 2010. В качестве альтернативы раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в экзосомы в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 4:1867, 2013. В качестве альтернативы раствор могли пропускать через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al., J Contr. Rel., 207: 18-30, 2015. В качестве альтернативы их могли подвергать электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 40(17):e130, 2012. Через 1 час загруженные РМР очищали с применением градиента сахарозы и промывали путем ультрацентрифугирования, как описано в **примере 2**, для удаления несвязанных низкомолекулярных соединений перед использованием. РМР, загруженные стрептомицином, характеризовали по размеру и дзета-потенциалу с применением способов из **примера 3**. В небольшом количестве РМР оценивали содержание стрептомицина с применением УФ-видимого излучения при 195 нм с применением стандартной кривой. Вкратце, получали исходные растворы стрептомицина в различных концентрациях, представляющих интерес, и 100 микролитров раствора помещали в прозрачный 96-луночный планшет с плоским дном. Поглощение при 195 нм измеряли с помощью UV-V планшет-ридера. Образцы также помещали в планшет и использовали уравнение регрессии для того, чтобы определить возможную

концентрацию в соответствии со стандартом. При недостаточно высоких концентрациях использовали протокол из Kurosawa et al., J. Chromatogr., 343:379-385, 1985. для измерения содержания стрептомицина с помощью HPLC. Стабильность загруженных стрептомицином РМР тестировали, как описано в **примере 4**.

б) Обработка E.coli с помощью РМР из грейпфрута, загруженных стрептомицином, для снижения приспособленности бактерий

E. coli получали из ATCC (№ 25922) и выращивали на триптиказо-соевом агаре/бульоне при 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Эффективные концентрации стрептомицина, РМР и РМР, загруженных стрептомицином, исследовали на способность предупреждать рост E.coli в соответствии с модифицированным стандартным дисковым диффузионным способом определения чувствительности.

Суспензию инокулята E. coli получали путем отбора нескольких морфологически схожих колоний, полученных в результате выращивания в течение ночи (16-24 ч. инкубации) на неселективной среде, с помощью стерильной петли или ватного тампона и суспендирования колоний в стерильном растворе хлорида натрия (0,85% NaCl вес/об. в воде) до плотности стандарта МакФарланда 0,5, что приблизительно соответствовало $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл. Чашки с агаром Мюллера-Хинтона (диаметром 150 мм) инокулировали суспензией E. coli, погружая стерильный ватный тампон в суспензию посевного материала, удаляя излишки жидкости с тампона и равномерно распределяя бактерии по всей поверхности чашки с агаром мазками в трех направлениях. Затем 3 мкл PBS (отрицательный контроль), РМР, загруженных стрептомицином, в концентрации, соответствующей эффективной дозе 0 (РМР-контроль), 2,5, 10, 50, 100 или 200 мг/мл, и стрептомицина в концентрации 200 мг/мл (+ контроль) точно наносили на чашку и давали высохнуть. Чашки инкубировали в течение 16-18 часов при 35°C, фотографировали и сканировали. Измеряли диаметр литической зоны (области без бактерий) вокруг области, на которую наносили РМР. Литические зоны после обработки контролем (PBS), стрептомицином, РМР и РМР, загруженными стрептомицином, сравнивали для определения бактерицидного эффекта.

Пример 13. Обработка нематоды пакетами-мессенджерами растений, загруженными белком/пептидом

В этом примере продемонстрирована загрузка РМР пептидной конструкцией с целью обеспечения снижения приспособленности паразитических нематод. Данный пример демонстрирует поглощение РМР, загруженных GFP, в пищеварительном тракте C. elegans, а также он демонстрирует, что РМР, нагруженные пептидом, являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях переработки и окружающей среды. В данном примере GFP использовали в качестве модельного пептида, а C. elegans использовали в качестве модельных нематод.

Терапевтическая доза

РМР, загруженные GFP, составляли в воде в концентрации, обеспечивающей концентрацию белка-GFP, загруженного в РМР, составляющую 0 (контроль,

представляющий собой незагруженный РМР), 10, 100 или 1000 мкг/мл.

Протокол эксперимента

а) Загрузка РМР из грейпфрута белком или пептидом

РМР получали из сока грейпфрута в соответствии с **примером 1**. Зеленый флуоресцентный белок синтезировали на коммерческой основе и солюбилизировали в PBS. РМР помещали в раствор с белком в PBS. Если белок или пептид были нерастворимы, рН корректировали, пока они не становились растворимыми. Если белок или пептид были все еще нерастворимыми, использовали нерастворимый белок или пептид. Затем раствор обрабатывали ультразвуком для индукции образования пор и диффузии в экзосомы в соответствии с протоколом из Wang et al., *Molecular Therapy*. 22(3): 522-534, 2014. В качестве альтернативы раствор могли пропускать через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al., *J Contr. Rel.*, 207: 18-30, 2015. В качестве альтернативы РМР могли подвергаться электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, *Nucl. Acids. Res.* 40(17):e130, 2012. Через 1 час РМР очищали с применением градиента сахарозы и промывали путем ультрацентрифугирования, как описано в **примере 1**, для удаления несвязанного белка перед использованием. Липосомы, полученные из РМР, характеризовали, как описано в **примере 3**, и их стабильность тестировали, как описано в **примере 4**. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли с помощью вестерн-блоттинга или флуоресценции.

б) Доставка модельного белка по отношению к нематоде

Штамм дикого типа N2 Bristol *C. elegans* (*C. elegans* Genomics Center) поддерживали на газоне *Escherichia coli* (штамм OP50) на планшетах с агаром, со средой для роста нематод (NGM) (3 г/л NaCl, 17 г/л агара, 2,5 г/л пептона, 5 мг/л холестерина, 25 мМ KН₂PO₄ (рН 6,0), 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄), при 20°C, от стадии L1 до L4.

Однодневных *C. elegans* переносили на новый планшет и скормливали им РМР, загруженные GFP, в концентрации 0 (контроль, представляющий собой незагруженный РМР), 10, 100 или 1000 мкг/мл в жидком растворе в соответствии с протоколом кормления, описанным в Conte et al., *Curr. Protoc. Mol. Bio.*, 109:26.3.1-30 2015. Затем гельминтов исследовали на поглощение РМР, загруженных GFP, в пищеварительном тракте путем применения флуоресцентного микроскопа для определения зеленой флуоресценции по сравнению с флуоресценцией при обработке незагруженным РМР и в контроле со стерильной водой.

Пример 14. Получение РМР из смешанных фруктовых соков с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы

В этом примере продемонстрировано, что РМР можно получать из плодов путем измельчения-смешивания плодов и использования комбинации последовательного центрифугирования для удаления остатков, ультрацентрифугирования для осаждения неочищенных РМР и использования градиента плотности сахарозы для очистки РМР. В этом примере грейпфрут использовали в качестве модельного плода.

а) Получение РМР из грейпфрута с помощью ультрацентрифугирования и очистки

в градиенте плотности сахарозы

Производственный процесс для получения РМР из грейпфрута с применением измельчителя, ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы показан на фиг. 1А. Один красный грейпфрут приобретали в магазине сети Whole Foods Market®, и альbedo, флаведо и сегментные мембраны удаляли для сбора соковых мешочков, которые гомогенизировали с применением измельчителя на максимальной скорости в течение 10 минут. Сто мл сока разбавляли 5х с помощью PBS с последующим центрифугированием при 1000х g в течение 10 минут, 3000х g в течение 20 минут и 10000х g в течение 40 минут с удалением крупных остатков. 28 мл очищенного сока ультрацентрифугировали на ультрамикрочентрифуге Sorvall™ MX 120 Plus при 150000х g в течение 90 минут при 4°C с использованием ротора с поворотным ковшом S50-ST (4×7 мл) для получения осадка неочищенных РМР, который ресуспендировали в PBS pH 7,4. Затем получали градиент сахарозы в Tris-HCL pH 7,2, неочищенные РМР наслаивали поверх градиента сахарозы (сверху вниз: 8, 15, 30, 45 и 60% сахарозы) и ультрацентрифугировали при 150 000х g в течение 120 минут при 4°C с применением ротора с поворотным ковшом S50-ST (4×7 мл). Собирали фракции по одному мл и выделяли РМР на границе раздела 30-45%. Фракции промывали с помощью PBS путем ультрацентрифугирования при 150 000х g в течение 120 минут при 4°C, и осадки растворяли в минимальном количестве PBS.

Концентрацию РМР (1×10^9 РМР/мл) и медианный размер РМР (121,8 нм) определяли с помощью анализатора частиц Spectradyne nCS1™ с применением картриджа TS-400 (фиг. 1В). Дзета-потенциал определяли с применением Zetasizer Ultra от Malvern и он составлял -11,5 +/- 0,357 мВ.

В этом примере продемонстрировано, что РМР из грейпфрута можно выделять с помощью ультрацентрифугирования в комбинации с методами очистки в градиенте сахарозы. Однако этот способ вызывал значительное гелеобразование в образцах на всех этапах получения РМР и в конечном растворе РМР.

Пример 15. Получение РМР из прессованных на сетке фруктовых соков с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы

В этом примере продемонстрировано, что уровень контаминантов, представляющих собой клеточную стенку и клеточную мембрану, можно уменьшать в процессе получения РМР посредством применения более мягкого процесса отжима сока (сетчатый фильтр). В этом примере грейпфрут использовали в качестве модельного плода.

а) Мягкий отжим сока снижает гелеобразование во время получения РМР из РМР из грейпфрута.

Соковые мешочки выделяли из красного грейпфрута, как описано в **примере 14**. Чтобы уменьшить гелеобразование во время получения РМР, вместо использования разрушающего способа измельчения-смешивания соковые мешочки осторожно прижимали к сетке ситечка для чая для сбора сока и уменьшения уровня контаминантов, представляющих клеточную стенку и клеточную мембрану. После дифференциального центрифугирования сок был более прозрачным, чем после использования измельчителя, и

после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы наблюдали одну чистую полосу сахарозы, содержащую РМР, на пересечении 30-45% (фигура 2). В целом во время и после получения РМР уровень гелеобразования был меньшим.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что использование стадии мягкого отжима сока обеспечивало снижение уровня гелеобразования, вызванного контаминантами во время получения РМР, по сравнению со способом, предусматривающим измельчение-смешивание.

Пример 16. Получение РМР с применением ультрацентрифугирования и эксклюзионной хроматографии

В этом примере описано получение РМР из плодов с применением ультрацентрифугирования (UC) и эксклюзионной хроматографии (SEC). В этом примере грейпфрут использовали в качестве модельного плода.

а) Получение РМР из грейпфрута с применением UC и SEC

Соковые мешочки выделяли из красного грейпфрута, как описано в **примере 14а**, и осторожно прижимали к сетке сита для чая для сбора 28 мл сока. Производственный процесс получения РМР из грейпфрута с применением UC и SEC изображен на фиг. 3А. Вкратце, сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000x g в течение 10 минут, 3000x g в течение 20 минут и 10000x g в течение 40 минут с удалением крупных остатков.

Ультрацентрифугировали 28 мл очищенного сока на ультрамикроцентрифуге Sorvall™ MX 120 Plus при 100000x g в течение 60 минут при 4° C с использованием ротора с поворотным ковшом S50-ST (4×7 мл) с получением осадка неочищенных РМР, который ресуспендировали в буфере MES (20 mM MES, NaCl, pH 6). После двукратной промывки осадков буфером MES конечный осадок ресуспендировали в 1 мл PBS, pH 7,4. Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР. Фракции, полученные в результате элюирования в ходе SEC, анализировали с помощью нанопроточной цитометрии с помощью NanoFCM для определения размера и концентрации РМР с применением стандартов концентрации и размеров, предоставленных производителем. Кроме того, для фракций, полученных в ходе SEC, определяли оптическую плотность при 280 нм (SpectraMax®) и концентрацию белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher), чтобы определить, в каких фракциях элюируются РМР (фиг. 3В-3D). Фракции 2-4, полученные в ходе SEC, идентифицировали как фракции, содержащие РМР. Анализ ранее и позднее элюирующихся фракций, показал, что фракция 3, полученные в ходе SEC, является основной фракцией, содержащей РМР, с концентрацией $2,83 \times 10^{11}$ РМР/мл (57,2% всех частиц в диапазоне размеров 50-120 нм) с медианным значением размера 83,6 нм +/- 14,2 нм (SD). Хотя поздно элюирующиеся фракции 8-13 характеризовались очень низкой концентрацией частиц, как показано с помощью NanoFCM, в этих фракциях с помощью ВСА-анализа обнаруживали белковые контаминанты.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что TFF и SEC можно

использовать для отделения очищенных РМР от поздно элюирующихся контаминантов, и что комбинация способов анализа, применяемая в данном документе, позволяла идентифицировать фракции РМР из поздно элюирующихся контаминантов.

Пример 17. Промышленное получение РМР с применением фильтрации в тангенциальном потоке и эксклюзионной хроматографии в комбинации с EDTA/диализом для снижения уровня контаминантов

В этом примере описано масштабированное получение РМР из плодов с применением фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) и эксклюзионной хроматографии (SEC) в комбинации с инкубацией с EDTA для уменьшения образования макромолекул пектина и диализом в течение ночи для снижения уровня контаминантов. В этом примере грейпфрут использовали в качестве модельного плода.

а) Получение РМР из грейпфрута с применением TFF и SEC

Красные грейпфруты приобретали в магазине сети Whole Foods Market®, и 1000 мл сока выделяли с применением соковыжималки. Производственный процесс получения РМР из грейпфрута с применением TFF и SEC изображен на фиг. 4А. Сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000x g в течение 10 минут, 3000x g в течение 20 минут и 10000x g в течение 40 минут с удалением крупных остатков. Очищенный грейпфрутовый сок концентрировали и один раз промывали с применением TFF (размер пор 5 нм) до 2 мл (100x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР. Фракции, полученные в результате элюирования в ходе SEC, анализировали с помощью нанопроточной цитометрии с помощью NanoFCM для определения концентрации РМР с применением стандартов концентрации и размеров, предоставленных производителем. Кроме того, для фракций, полученных в ходе SEC, определяли концентрацию белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для определения фракций, в которых элюировались РМР. В ходе масштабированного получения при концентрировании из 1 литра сока (100x концентрированного) также получили большое количество контаминантов в поздних фракциях, полученных в ходе SEC, как можно было обнаружить с помощью BCA-анализа (фиг. 4В, верхняя панель). Суммарный общий выход РМР (фиг. 4В, нижняя панель) был ниже при масштабированном получении по сравнению с выделением из отдельного грейпфрута, что могло указывать на потерю РМР.

б) Снижение уровня контаминантов за счет инкубации с EDTA и диализа

Красные грейпфруты приобретали в магазине сети Whole Foods Market®, и 800 мл сока выделяли с применением соковыжималки. Сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000x g в течение 10 минут, 3000x g в течение 20 минут и 10000x g в течение 40 минут с удалением крупных остатков, и фильтровали через фильтр с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм с удалением крупных частиц. Очищенный грейпфрутовый сок разделяли на 4 различные группы обработки, каждая из которых содержала 125 мл сока. Группу обработки 1 обрабатывали, как описано в **примере 17а**, концентрировали, промывали (PBS) до конечной концентрации 63x и подвергали SEC. Перед TFF 475 мл

сока инкубировали с EDTA в конечной концентрации 50 мМ, рН 7,15 в течение 1,5 часа при к. т. для обеспечения хелатирования железа и уменьшения уровня образования макромолекул пектина. После этого сок разделяли на три группы обработки, которые подвергали концентрированию посредством TFF с промывкой с помощью либо PBS (без кальция/магния) рН 7,4, либо MES рН 6, либо Tris рН 8,6 до конечной концентрации сока 63X. Затем образцы подвергали диализу в том же промывочном буфере в течение ночи при 4°C с применением мембраны на 300 кДа и подвергали SEC. По сравнению с пиком с высоким содержанием примесей во фракциях позднего элюирования в контроле с обработкой посредством только TFF, инкубация с EDTA с последующим диализом в течение ночи приводила к значительному снижению уровня контаминантов, о чем свидетельствовала оптическая плотность при 280 нм (фиг. 4C) и ВСА-анализ белка (фиг. 4D), который чувствителен к присутствию сахаров и пектинов. Не было разницы в используемых буферах для диализа (PBS без кальция/магния, рН 7,4, MES рН 6, Tris рН 8,6).

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что инкубация с EDTA с последующим диализом снижала количество контаминантов, совместно получаемых при очистке, облегчая масштабированное получение РМР.

Пример 18. Стабильность РМР

В этом примере продемонстрировано, что РМР являются стабильными в различных условиях окружающей среды. В этом примере РМР из грейпфрута и лимона использовали в качестве модельных РМР.

а) Получение РМР из грейпфрута с применением TFF в комбинации с SEC

Красные органические грейпфруты (Флорида) приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Схема получения РМР изображена на фиг. 5А. Один литр грейпфрутового сока собирали с применением соковыжималки и затем центрифугировали при 3000 x g в течение 20 минут, а затем при 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, рН 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, рН 7, и раствор инкубировали в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтры с размерами пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали и промывали (500 мл PBS) посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) (размер пор 5 нм) до 400 мл (2,5x) и подвергали диализу в течение ночи в PBS, рН 7,4 (с одной заменой среды) с применением мембраны для диализа на 300 кДа для удаления контаминантов. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации, содержащейся в 50 мл (20x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (ВСА-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций,

содержащих контаминанты (фиг. 5B и 5C). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР (фракции 8-14 содержали контаминанты), объединяли вместе и стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм. Конечную концентрацию РМР ($1,32 \times 10^{11}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (71,9 нм +/- 14,5 нм) в объединенных стерилизованных фракциях, содержащих РМР, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 5F).

b) Получение РМР из лимона с применением TFF в комбинации с SEC

Лимоны приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Один литр лимонного сока собирали с помощью соковыжималки и затем центрифугировали при $3000 \times g$ в течение 20 минут, а затем при $10000 \times g$ в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7, и раствор инкубировали в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтр для кофе, фильтры с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) (размер пор 5 нм) до 400 мл (концентрированный в 2,5 раза) и подвергали диализу в течение ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа на 300 кДа для удаления контаминантов. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации, содержащейся в 50 мл (20x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 5D и 5E). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР (фракции 8-14 содержали контаминанты), объединяли вместе и стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм. Конечную концентрацию РМР ($2,7 \times 10^{11}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (70,7 нм +/- 15,8 нм) в объединенных стерилизованных фракциях, содержащих РМР, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 5G).

c) Стабильность РМР из грейпфрута и лимона при 4°C

РМР из грейпфрута и лимона получали, как описано в **примерах 18a** и **18b**. Стабильность РМР оценивали путем измерения концентрации общих РМР (РМР/мл) в образце с течением времени с применением NanoFCM. Исследование стабильности проводили при 4°C в течение 46 дней в темноте. Аликвоты РМР хранили при 4°C и анализировали с помощью NanoFCM в предварительно определенные дни.

Анализировали концентрации общих РМР в образце (фиг. 5Н). Относительная измеренная концентрация РМР из лимона и грейпфрута на промежутке времени между исходной и конечной точкой эксперимента через 46 дней составляла 119% и 107% соответственно. Данные авторов настоящего изобретения показали, что РМР являются стабильными в течение по меньшей мере 46 дней при 4°C.

d) Стабильность при РМР из лимона замораживании-размораживании

Для определения стабильности РМР при замораживании-размораживании РМР из лимона получали из органических лимонов, приобретенных в магазине сети Whole Foods Market®. Один литр лимонного сока собирали с помощью соковыжималки и затем центрифугировали при 3000× g в течение 20 минут, а затем при 10000× g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,5, и инкубировали в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтры с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали и промывали с помощью 400 мл PBS, pH 7,4 посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) до конечного объема 400 мл (концентрированный в 2,5 раза) и подвергали диализу в течение ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа на 300 кДа для удаления контаминантов. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации 60 мл (~17x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР (фракции 8-14 содержали контаминанты), объединяли вместе и стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм. Конечную концентрацию РМР ($6,92 \times 10^{12}$ РМР/мл) в объединенных стерилизованных фракциях, содержащих РМР, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

РМР из лимона замораживали при -20°C или -80°C в течение одной недели, размораживали при комнатной температуре и измеряли концентрацию с помощью NanoFCM (фиг. 5I). Данные показывают, что РМР из лимона являются стабильными после 1 цикла замораживания-размораживания после хранения в течение одной недели при -20°C или -80°C.

Пример 19. Получение РМР из среды для культивирования клеток растений

В этом примере продемонстрировано, что РМР можно получать из культуры клеток растений. В этом примере линию клеток *Zea mays* Black Mexican Sweet (BMS) использовали в качестве модельной линии клеток растений.

a) Получение РМР из линии клеток Zea mays BMS

Линию клеток *Zea mays* Black Mexican sweet (BMS) приобретали в ABRC и выращивали в базовой среде Мурасиге-Скуга pH 5,8, содержащей 4,3 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma M5524), 2% сахарозы (S0389, Millipore Sigma), 1x раствор витаминов MS (M3900, Millipore Sigma), 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (D7299, Millipore Sigma) и 250 мкг/л тиамина HCL (V-014, Millipore Sigma), при 24°C с перемешиванием (110 об./мин.), и пересевали из расчета 20% объем/объем каждые 7 дней.

Через три дня после пересева собирали 160 мл клеток BMS и центрифугировали при $500 \times g$ в течение 5 мин. с удалением клеток и $10000 \times g$ в течение 40 мин. с удалением крупных остатков. Среду пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм с удалением крупных частиц, и фильтрованную среду концентрировали и промывали (100 мл буфера MES, 20 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6) посредством TFF (размер пор 5 нм) до 4 мл (40x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали с помощью NanoFCM для определения концентрации РМР, анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 6A-6C). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержали очищенные РМР (фракции 9-13 содержали контаминанты) и их объединяли вместе. Конечную концентрацию РМР ($2,84 \times 10^{10}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (63,2 нм +/- 12,3 нм SD) в объединенных фракциях, содержащих РМР, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 6D-6E).

Эти данные показывают, что РМР можно выделять, очищать и концентрировать из жидких питательных сред для растений.

Пример 20. Захват РМР бактериями и грибами

В этом примере продемонстрирована способность РМР ассоциировать с бактериями и грибами и захватываться ими. В данном примере РМР из грейпфрута и лимона использовали в качестве модели РМР, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* использовали в качестве модельных патогенных бактерий, а дрожжевой грибок *Saccharomyces cerevisiae* использовали в качестве модельного патогенного гриба.

a) Мечение РМР из грейпфрута и лимона сложным эфиром NHS DyLight 800

РМР из грейпфрута и лимона получали, как описано в **примерах 18a** и **18b**. РМР метили ковалентным красителем для мембран, представляющим собой сложный эфир NHS DyLight 800 (Life Technologies, № 46421) (DyL800). Вкратце, DyL800 растворяли в DMSO до конечной концентрации 10 мг/мл, и 200 мкл РМР смешивали с 5 мкл красителя и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре на шейкере. Меченые РМР промывали 2-3 раза с помощью ультрацентрифуги при $100000 \times g$ в течение 1 ч. при 4°C, и осадки ресуспендировали с помощью 1,5 мл ультрачистой воды. Для контроля наличия потенциальных агрегатов красителя получали контрольный образец, содержащий только

краситель, в соответствии с той же процедурой, добавив 200 мкл ультрачистой воды вместо РМР. Конечный осадок РМР, меченных DyL800, и контроль, содержащий только краситель DyL800, ресуспендировали в минимальном количестве ультрачистой воды и характеризовали с помощью NanoFCM. Конечная концентрация РМР из грейпфрута, меченных DyL800, составляла $4,44 \times 10^{12}$ РМР/мл, со средним размером DyL800-РМР 72,6 нм +/- 14,6 нм (фиг. 7А), а конечная концентрация РМР из лимона, меченных DyL800, составляла $5,18 \times 10^{12}$ РМР/мл со средним размером DyL800-РМР 68,5 нм +/- 14 нм (фиг. 7В).

б. Захват РМР из грейпфрута и лимона, меченых DyL800, дрожжевым грибом

Saccharomyces cerevisiae (АТСС, № 9763) выращивали на бульоне дрожжевого экстракта пептон-декстрозы (YPD) и поддерживали при 30°C. Чтобы определить, могут ли РМР захватываться дрожжевыми грибами, 5 мл свежей культуры дрожжевых грибов выращивали в течение ночи при 30°C и клетки осаждали при 1500 x g в течение 5 мин. и ресуспендировали в 10 мл воды. Клетки дрожжевых грибов промывали один раз с помощью 10 мл воды, ресуспендировали в 10 мл воды и инкубировали в течение 2 ч. при 30°C при встряхивании для того, чтобы обеспечить недостаток питательных веществ у клеток. Затем 95 мкл клеток дрожжевых грибов смешивали с 5 мкл воды (отрицательный контроль), контролем, содержащий только краситель DyL800 (контроль агрегированного красителя), или DyL800-РМР до конечной концентрации 5×10^{10} DyL800-РМР/мл в пробирке объемом 1,5 мл. Образцы инкубировали в течение 2 ч. при 30°C при встряхивании. Затем обработанные клетки промывали с помощью 1 мл промывочного буфера (вода с добавлением 0,5% Triton X-100), инкубировали в течение 5 мин. и центрифугировали при 1500 x g в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клетки дрожжевых грибов промывали еще 3 раза для удаления РМР, которые не захватились клетками, и последний раз водой для удаления детергента. Клетки дрожжевых грибов ресуспендировали в 100 мкл воды, и переносили в 96-луночный планшет с прозрачным дном, и измеряли относительную интенсивность флуоресценции (A.U.) при длине волны возбуждения 800 нм на сканере Odyssey® CLx (Li-Cor).

Для оценки захвата DyL800-РМР дрожжевыми грибами образцы нормализовали по контролю, содержащему только краситель DyL800, и сравнивали относительные интенсивности флуоресценции DyL800-РМР из грейпфрута и лимона. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что *Saccharomyces cerevisiae* захватывает РМР и различия в захвате между DyL800-РМР из лимона и грейпфрута не наблюдали (фиг. 7С).

с) Захват РМР из грейпфрута и лимона, меченых DyL800, бактериями

Штаммы бактерий и дрожжевых грибов поддерживали, как указано поставщиком: *E. coli* (Ec, АТСС, № 25922) выращивали на триптиказо-соевом агаре/бульоне при 37°C, а *Pseudomonas aeruginosa* (Pa, АТСС) выращивали на триптическом соевом агаре/бульоне с 50 мг/мл рифампицина при 37°C.

Чтобы определить, могут ли РМР захватываться бактериями, 5 мл свежих культур бактерий выращивали в течение ночи и клетки осаждали при 3000 x g в течение 5 мин.,

ресуспендировали в 5 мл 10 мМ MgCl₂, промывали один раз с помощью 5 мл 10 мМ MgCl₂ и ресуспендировали в 5 мл 10 мМ MgCl₂. Клетки инкубировали в течение 2 ч. при 37°C (Ec) или 30°C (Pa) в инкубаторе со встряхиванием при ~200 об./мин. для того, чтобы обеспечить недостаток питательных веществ у клеток. Определяли OD₆₀₀ и доводили плотность клеток до ~10×10⁹ КОЕ/мл. Затем 95 мкл бактериальных клеток смешивали с 5 мкл воды (отрицательный контроль), с контролем, содержащим только краситель DyL800 (контроль агрегированного красителя), или с DyL800-РМР до конечной концентрации 5×10¹⁰ DyL800-РМР/мл в пробирке объемом 1,5 мл. Образцы инкубировали в течение 2 ч. при 30°C при встряхивании. Затем обработанные клетки промывали с помощью 1 мл промывочного буфера (10 мМ MgCl₂ с добавлением 0,5% Triton X-100), инкубировали в течение 5 мин. и центрифугировали при 3000 x g в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клетки дрожжевых грибов промывали еще 3 раза для удаления РМР, которые не захватываются клетками, и один раз с помощью 1 мл 10 мМ MgCl₂ для удаления детергента. Бактериальные клетки ресуспендировали в 100 мкл 10 мМ MgCl₂, переносили в 96-луночный планшет с прозрачным дном и измеряли относительную интенсивность флуоресценции (A.U.) при длине волны возбуждения 800 нм на сканере Odyssey® CLx (Li-Cor).

Для оценки захвата DyL800-РМР бактериями образцы нормализовали по контролю, содержащему только краситель DyL800, и сравнивали относительные интенсивности флуоресценции DyL800-РМР из грейпфрута и лимона. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что все протестированные виды бактерий захватывают РМР (фиг. 7С). В общем, предпочтительнее захватывались РМР из лимона (более высокая интенсивность сигнала, чем в случае РМР из грейпфрута). *E. coli* и *P. aeruginosa* демонстрировали наиболее высокий уровень захвата DyL800-РМР.

Пример 21. Захват РМР клетками насекомых

В этом примере продемонстрирована способность РМР ассоциировать с клетками насекомых и захватываться ими. В этом примере клетки sf9 *Spodoptera frugiperda* (насекомое) и линии клеток S2 *Drosophila melanogaster* (насекомое) использовали в качестве модельных клеток насекомых, а РМР из лимона использовали в качестве модельных РМР.

а) Получение РМР из лимона

Лимоны приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Лимонный сок (3,3 л) собирали с применением соковыжималки, pH доводили до pH 4 с помощью NaOH и инкубировали с 0,5 Ед./мл пектиназы (Sigma, 17389) для удаления контаминантов, представляющих собой пектин. Сок инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре при перемешивании и хранили в течение ночи при 4°C, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут, а затем 10000 g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем обработанный сок инкубировали с 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,5 в течение 30 минут при комнатной температуре для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования

макромолекул пектина. Впоследствии сок, обработанный EDTA, пропускали через фильтр с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок промывали (300 мл PBS во время процедуры TFF) и концентрировали 2х до общего объема 1350 мл посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) и подвергали диализу в течение ночи с применением мембраны для диализа на 300 кДа. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно промывали (500 мл PMS во время процедуры TFF) и концентрировали посредством TFF до конечной концентрации 160 мл (~20х). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, и анализировали оптическую плотность при 280 нм (SpectraMax®) для определения фракций, содержащих РМР, из фракций позднего элюирования, содержащих контаминанты. Фракции 4-7, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР, объединяли вместе, стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,85 мкм, 0,4 мкм и 0,22 мкм и дополнительно концентрировали путем осаждения РМР в течение 1,5 ч. при 40000х g, и, наконец, осадок ресуспендировали в ультрачистой воде. Конечную концентрацию РМР ($1,53 \times 10^{13}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (72,4 нм +/- 19,8 нм SD) (фиг. 8А) определяли с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM) с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем, и концентрацию белка РМР (12,317 мг/мл) определяли с применением ВСА-анализа Pierce™ (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя.

б) Мечение РМР из лимона сложным эфиром NHS и Alexa Fluor 488

РМР из лимона метили ковалентным красителем для мембран, представляющим собой сложный эфир NHS и Alexa Fluor 488 (Life Technologies) (AF488). Вкратце, AF488 растворяли в DMSO до конечной концентрации 10 мг/мл, 200 мкл РМР ($1,53 \times 10^{13}$ РМР/мл) смешивали с 5 мкл красителя, инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре на шейкере, и меченые РМР промывали 2-3 раза с помощью ультрацентрифуги при 100000 x g в течение 1 ч. при 4°C и осадки ресуспендировали в 1,5 мл ультрачистой воды. Для контроля наличия потенциальных агрегатов красителя получали контрольный образец, содержащий только краситель, в соответствии с той же процедурой, добавив 200 мкл ультрачистой воды вместо РМР. Конечный осадок РМР, меченных AF488, и контроль, содержащий только краситель AF488, ресуспендировали в минимальном количестве ультрачистой воды и характеризовали с помощью NanoFCM. Конечная концентрация РМР, меченных AF488, составляла $1,33 \times 10^{13}$ РМР/мл со средним размером AF488-РМР 72,1 нм +/- 15,9 нм SD, а эффективность мечения достигала 99% (фиг. 8В).

с) Обработка клеток насекомых с помощью AF488-РМР из лимона

РМР из лимона получали и метили, как описано в **примерах 21а** и **21б**. Линию клеток sf9 *Spodoptera frugiperda* получали из ThermoFisher Scientific (№ В82501) и поддерживали в среде для насекомых TNM-FH (Sigma Aldrich, T1032) с добавлением 10%

инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки. Линию клеток S2 *Drosophila melanogaster* получали из ATCC (№ CRL-1963) и поддерживали в среде Шнайдера для дрозофил (Gibco/ThermoFisher Scientific № 21720024) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки. Обе линии клеток выращивали при 26°C. Для обработки с помощью PMP клетки S2/Sf9 высевали при 50% конfluence на стерильные покрытые 0,01% поли-L-лизинном стеклянные покровные стекла в 24-луночной планшете в 2 мл полной среды и оставляли для прикрепления к покровному стеклу на ночь. Затем клетки обрабатывали путем добавления только 10 мкл красителя AF488 (контроль агрегированного красителя), PMP из лимона (контроль, содержащий только PMP) или AF488-PMP для дублирования образцов, которые инкубировали в течение 2 часов при 26°C. Конечная концентрация составляла $1,33 \times 10^{11}$ PMP/AF488-PMP на лунку. Затем клетки дважды промывали с помощью 1 мл PBS и фиксировали в течение 15 мин. 4% формальдегидом в PBS. Затем клетки пермеабелизовали с помощью PBS+0,02% Triton X-100 в течение 15 мин., и ядра окрашивали раствором DAPI 1:1000 в течение 30 мин. Клетки один раз промывали с помощью PBS и покровные стекла помещали на предметные стекла сTM ProLong Gold Antifade (ThermoFisher Scientific) для уменьшения фотообесцвечивания. Смолу оставляли на ночь, клетки исследовали на эпифлуоресцентном микроскопе Olympus с применением 100x объектива и получали изображения срезов по оси Z размером 10 мкм с шагом 0,25 мкм. Аналогичные результаты были получены как для клеток S2 *D. melanogaster*, так и для клеток S9 *L. frugiperda*. В то время как в контроле, содержащем только краситель AF488, и в контроле, содержащем только PMP, очагов с зеленой окраской не наблюдали, почти все клетки насекомых, обработанные с помощью AF488-PMP, демонстрировали очаги с зеленой окраской внутри клеток насекомых. В цитоплазме имел место сильный сигнал с несколькими яркими более крупными очагами, указывающими на наличие эндосомных компартментов. Вследствие просачивания DAPI в канал 488 было невозможно оценить наличие сигнала AF488-PMP в ядре. В случае клеток sf9 94,4% (n=38) исследованных клеток содержали очаги с зеленой окраской, в то время как этого не наблюдали в контрольных образцах, содержащих только краситель AF488 (n=68) или только PMP (n=42).

Данные авторов настоящего изобретения свидетельствуют о том, что PMP могут ассоциировать с мембранами клеток насекомых и могут эффективно захватываться клетками насекомых.

Пример 22. Загрузка PMP низкомолекулярным соединением

В этом примере продемонстрировано загрузку PMP модельным низкомолекулярным соединением с целью доставки средства с применением различных источников PMP и способов инкапсуляции. В этом примере доксорубицин использовали в качестве модельного низкомолекулярного соединения, а PMP из лимона и грейпфрута использовали в качестве модельных PMP.

Авторы настоящего изобретения показали, что PMP можно эффективно загружать

доксорубицином, и что загруженные РМР являются стабильными в течение по меньшей мере 8 недель при 4°C.

а) Получение РМР из грейпфрута с применением TFF в комбинации с SEC

Белые грейпфруты (Флорида) приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Один литр грейпфрутового сока собирали с помощью соковыжималки и затем центрифугировали при 3000× g в течение 20 минут, а затем при 10000× g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7, и инкубировали в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтр для кофе и фильтры с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF, размер пор 5 нм) до 400 мл и подвергали диализу в течение ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа на 300 кДа для удаления контаминантов. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации, содержащейся в 50 мл (20х). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 9А). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР, объединяли вместе, и дополнительно концентрировали путем осаждения РМР в течение 1,5 ч. при 40000х g, и осадок ресуспендировали в ультрачистой воде. Конечную концентрацию РМР ($6,34 \times 10^{12}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (63,7 нм +/- 11,5 нм SD) определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 9В и 9С).

б) Получение РМР из лимона с применением TFF в комбинации с SEC

Лимоны приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Один литр лимонного сока собирали с помощью соковыжималки и затем центрифугировали при 3000× g в течение 20 минут, а затем при 10000× g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7, и инкубировали в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтр для кофе, фильтры с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм фильтры для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF, размер пор 5 нм) до 400 мл и подвергали диализу в течение ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа на 300 кДа для удаления контаминантов. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации, содержащейся в 50 мл (20х). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности

при 280 нм (SpectraMax®) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 9D). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные РМР, объединяли вместе, и дополнительно концентрировали путем осаждения РМР в течение 1,5 ч. при 40000x g, и осадок ресуспендировали в ультрачистой воде. Конечную концентрацию РМР ($7,42 \times 10^{12}$ РМР/мл) и медианный размер РМР (68 нм +/- 17,5 нм SD) определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 9E и 9F).

с) Пассивная загрузка доксорубицина в РМР из лимона и грейпфрута

РМР из грейпфрута (**пример 22а**) и лимона (**пример 22b**) использовали для загрузки доксорубицина (DOX). Исходный раствор доксорубицина (DOX, Sigma PNR1789) получали в концентрации 10 мг/мл в ультрачистой воде (вода UltraPure™, не содержащая DNase/RNase, ThermoFisher, 10977023), стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм) и хранили при 4°C. 0,5 мл РМР смешивали с 0,25 мл раствора DOX. Конечная концентрация DOX в смеси составляла 3,3 мг/мл. Исходная концентрация частиц для РМР из грейпфрута (GF) составляла $9,8 \times 10^{12}$ РМР/мл, а для РМР из лимона (LM) составляла $1,8 \times 10^{13}$ РМР/мл. Смесь перемешивали в течение 4 часов при 25°C, 100 об./мин. в темноте. Затем смесь разбавляли в 3,3 раза ультрачистой водой (конечная концентрация DOX в смеси составляла 1 мг/мл) и разделяли на две равные части (1,25 мл для пассивной загрузки и 1,25 мл для активной загрузки (**пример 22d**)). Оба образца инкубировали в течение дополнительных 23 ч. при 25°C, 100 об./мин. в темноте. Все стадии проводили в стерильных условиях.

В случае пассивной загрузки DOX, чтобы удалить не загрузившийся или слабо связанный DOX, образец очищали путем ультрацентрифугирования. Смесь разделяли на 6 равных частей (по 200 мкл каждая) и добавляли стерильную воду (1,3 мл). Образцы центрифугировали (40000x g, 1,5 ч., 4°C) в ультрацентрифужных пробирках объемом 1,5 мл. Осадки РМР-DOX ресуспендировали в стерильной воде и дважды центрифугировали. Образцы хранили при 4°C в течение трех дней.

Перед использованием РМР, нагруженные DOX, еще раз промывали путем ультрацентрифугирования (40000x g, 1,5 ч., 4°C). Конечный осадок ресуспендировали в стерильной ультрачистой воде и хранили при 4°C до дальнейшего использования. Концентрацию DOX в РМР определяли с помощью спектрофотометра SpectraMax (Ex/Em=485/550 нм), а концентрацию общего числа частиц определяли с помощью нанопоточной цитометрии (NanoFCM).

d) Активная загрузка доксорубицина в РМР из лимона и грейпфрута

РМР из грейпфрута (**пример 22а**) и лимона (**пример 22b**) использовали для загрузки доксорубицина (DOX). Исходный раствор доксорубицина (DOX, Sigma PNR1789) получали в концентрации 10 мг/мл в ультрачистой воде (ThermoFisher, 10977023), стерилизовали (0,22 мкм) и хранили при 4°C. 0,5 мл РМР смешивали с 0,25 мл раствора DOX. Конечная концентрация DOX в смеси составляла 3,3 мг/мл. Исходная концентрация частиц для РМР из грейпфрута (GF) составляла $9,8 \times 10^{12}$ РМР/мл, а для РМР

из лимона (LM) составляла $1,8 \times 10^{13}$ PMP/мл. Смесь перемешивали в течение 4 часов при 25°C, 100 об./мин. в темноте. Затем смесь разбавляли в 3,3 раза ультрачистой водой (конечная концентрация DOX в смеси составляла 1 мг/мл) и разделяли на две равные части (1,25 мл для пассивной загрузки (**пример 22e**) и 1,25 мл для активной загрузки). Оба образца инкубировали в течение дополнительных 23 ч. при 25°C, 100 об./мин. в темноте. Все стадии проводили в стерильных условиях.

После инкубации при 25°C в течение дня смесь выдерживали при 4°C в течение 4 дней. Затем смесь обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. в бане для обработки ультразвуком (Branson 2800) при 42°C, встряхивали на вортексе и обрабатывали ультразвуком еще раз в течение 20 мин. Затем смесь разбавляли в два раза стерильной водой и экструдировали с применением мини-экструдера Avanti (Avanti Lipids). Чтобы уменьшить количество липидных бислоев и общий размер частиц, PMP, загруженные DOX, экструдировали посредством способа со ступенчатым уменьшением размера отверстий: 800 нм, 400 нм и 200 нм для PMP из грейпфрута (GF); и 800 нм, 400 нм для PMP из лимона (LM). Для удаления не загрузившегося или слабо связанного DOX образцы промывали с помощью подхода на основе ультрацентрифугирования. В частности, образец (1,5 мл) разбавляли стерильной ультрачистой водой (всего 6,5 мл) и дважды центрифугировали при 40000x g в течение 1 ч. при 4°C в ультрацентрифужных пробирках объемом 7 мл. Конечный осадок ресуспендировали в стерильной ультрачистой воде и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

e) Определение нагрузочной способности PMP, загруженных DOX, полученных с помощью пассивной и активной загрузки

Чтобы оценить способность к загрузке DOX в PMP, концентрацию DOX оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции ($E_x/E_m=485/550$ нм) с применением спектрофотометра SpectraMax®. Использовали калибровочную кривую, построенную по концентрации свободного DOX от 0 до 83,3 мкг/мл. Для диссоциации PMP, загруженных DOX, и комплексов DOX (π - π стекирование) образцы и стандарты инкубировали с 1% SDS при 37°C за 30 мин. до измерений флуоресценции. Загрузочную способность (пг DOX на 1000 частиц) рассчитывали в виде концентрации DOX (пг/мл), деленной на общую концентрацию PMP (PMP/мл) (фиг. 9G). Загрузочная способность в случае пассивно загруженных PMP составляла 0,55 пг DOX (GF PMP-DOX) и 0,25 пг DOX (LM PMP-DOX) для 1000 PMP. Загрузочная способность в случае активно загруженных PMP составляла 0,23 пг DOX (GF PMP-DOX) и 0,27 пг DOX (LM PMP-DOX) для 1000 PMP.

f) Стабильность PMP из грейпфрута и лимона, загруженных доксорубицином

Стабильность PMP, загруженных DOX, оценивали путем измерения концентрации общих PMP (PMP/мл) в образце с течением времени с применением NanoFCM. Исследование стабильности проводили при 4°C в течение восьми недель в темноте. Аликвоты PMP-DOX хранили при 4°C и анализировали с помощью NanoFCM в предварительно определенные дни. Размер частиц PMP-DOX существенно не изменялся.

Таким образом, в случае РМР, пассивно загруженных с помощью GF, диапазон средних размеров частиц составлял 70-80 нм в течение двух месяцев. Анализировали концентрации общих РМР в образце (фиг. 9Н). Диапазон концентраций для РМР, пассивно загруженных с помощью GF, составлял от $2,06 \times 10^{11}$ до $3,06 \times 10^{11}$ РМР/мл, для РМР, активно загруженных с помощью GF, он составлял от $5,55 \times 10^{11}$ до $9,97 \times 10^{11}$ РМР/мл, и для РМР, пассивно загруженных с помощью LM, он составлял от $8,52 \times 10^{11}$ до $1,76 \times 10^{12}$ РМР/мл в течение восьми недель при 4°C. Данные авторов настоящего изобретения указывали на то, что РМР, загруженные DOX, являются стабильными в течение 8 недель при 4 °С.

Пример 23. Обработка бактерий и грибов с помощью РМР, загруженных низкомолекулярным соединением

В этом примере продемонстрирована способность РМР к загрузке низкомолекулярным соединением с целью обеспечения снижения приспособленности патогенных бактерий и грибов. В данном примере РМР из грейпфрута использовали в качестве модельного РМР, *E. coli* и *P. aeruginosa* использовали в качестве модельных патогенных бактерий, дрожжевой грибок *S. cerevisiae* использовали в качестве модельного патогенного гриба, а доксорубицин использовали в качестве модельного низкомолекулярного соединения. Доксорубицин представляет собой цитотоксический антрациклиновый антибиотик, выделенный из культур *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Доксорубицин взаимодействует с ДНК путем интеркаляции и ингибирует как репликацию ДНК, так и транскрипцию РНК. Было показано, что доксорубицин обладает антибиотической активностью (Westman et al., *Chem Biol*, 19(10): 1255-1264, 2012.)

а) Получение РМР из грейпфрута с применением TFF в комбинации с SEC

Красные органические грейпфруты приобретали в магазине сети Whole Foods Market®. Общий вид схемы получения РМР представлен на фиг. 10А. Четыре литра грейпфрутового сока собирали с помощью соковыжималки, рН доводили до рН 4 с помощью NaOH, инкубировали с 1 Ед./мл пектиназы (Sigma, 17389) для удаления контаминантов, представляющих собой пектин, и затем центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут, после чего при 10000 g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем обработанный сок инкубировали с 500 мМ EDTA, рН 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, рН 7,7 в течение 30 минут для обеспечения хелатирования кальция и предупреждения образования макромолекул пектина. Впоследствии сок, обработанный EDTA, пропускали через фильтр с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок промывали и концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), используя TFF 300 кДа. Сок концентрировали 5х, после чего выполняли промывку с обменом с помощью 6 объемов PBS и далее фильтровали до конечной концентрации 198 мл (20х). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали в отношении оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и концентрации белка (BCA-анализ Pierce™ ThermoFisher) для

подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 10В и 10С). Фракции 3-7, полученные в ходе SEC, содержали очищенные РМР (фракции 9-12 содержали контаминанты), объединяли вместе, стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм и дополнительно концентрировали путем осаждения РМР в течение 1,5 ч. при 40000 x g и ресуспендирования осадка в 4 мл дистиллированной воды UltraPure™, не содержащей DNase/RNase (ThermoFisher, 10977023). Конечную концентрацию РМР ($7,56 \times 10^{12}$ РМР/мл) и средний размер РМР (70,3 нм +/- 12,4 нм SD) определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 10D и 10E). Полученные РМР из грейпфрута использовали для загрузки доксорубина.

б) Загрузка доксорубина в РМР из грейпфрута

РМР из грейпфрута, полученные в **примере 23а**, использовали для загрузки доксорубина (DOX). Исходный раствор доксорубина (Sigma PHR1789) получали в концентрации 10 мг/мл в ультрачистой воде и стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм). Стерильные РМР из грейпфрута (3 мл при концентрации частиц $7,56 \times 10^{12}$ РМР/мл) смешивали с 1,29 мл раствора DOX. Конечная концентрация DOX в смеси составляла 3 мг/мл. Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин. в бане для обработки ультразвуком (Branson 2800) с повышением температуры до 40°C и выдерживали в бане в течение дополнительных 15 минут без обработки ультразвуком. Смесь перемешивали в течение 4 часов при 24°C, 100 об./мин. в темноте. Затем смесь экстрадировали с применением мини-экструдера Avanti (Avanti Lipids). Чтобы уменьшить количество липидных бислоев и общий размер частиц, РМР, загруженные DOX, экстрадировали посредством способа со ступенчатым уменьшением размера отверстий: 800 нм, 400 нм и 200 нм. Подвергнутый экстрадированию образец стерилизовали фильтрованием путем последовательного пропускания через фильтр с размером пор 0,8 мкм и 0,45 мкм (Millipore, диаметр 13 мм) в вытяжном шкафу для ТС. Для удаления не загрузившегося или слабо связанного DOX образец очищали с помощью подхода на основе ультрацентрифугирования. В частности, образец центрифугировали при 100000x g в течение 1 ч. при 4°C в ультрацентрифужных пробирках объемом 1,5 мл. Супернатант собирали для дополнительного анализа и хранили при 4°C. Осадок ресуспендировали в стерильной воде и ультрацентрифугировали в тех же условиях. Эту стадию повторяли четыре раза. Конечный осадок ресуспендировали в стерильной ультрачистой воде и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Далее определяли концентрацию частиц и загрузочную способность РМР. Общее количество РМР в образце ($4,76 \times 10^{12}$ РМР/мл) и средний размер частиц (72,8 нм +/- 21 нм SD) определяли с применением NanoFCM. Концентрацию DOX оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции (Ex/Em=485/550 нм) с применением спектрофотометра SpectraMax®. Получали калибровочную кривую, построенную по

концентрации свободного DOX от 0 до 50 мкг/мл в стерильной воде. Для диссоциации PMP, загруженных DOX, и комплексов DOX (π - π стекирование) образцы и стандарты инкубировали с 1% SDS при 37°C в течение 45 мин. перед измерениями флуоресценции. Загрузочную способность (пг DOX на 1000 частиц) рассчитывали в виде концентрации DOX (пг/мл), деленной на общее количество PMP (PMP/мл). Загрузочная способность PMP-DOX составляла 1,2 пг DOX на 1000 PMP. Однако следует отметить, что эффективность загрузки (% PMP, загруженных DOX, по сравнению с общим количеством PMP) не могли оценить, поскольку спектр флуоресценции DOX не мог быть обнаружен на NanoFCM.

Результаты авторов настоящего изобретения показали, что PMP можно эффективно загружать низкомолекулярным соединением.

с) *Обработка бактерий и дрожжевых грибов с помощью PMP из грейпфрута, загруженных Dox*

Чтобы установить, что PMP могут доставлять цитотоксическое средство, несколько видов микроорганизмов обрабатывали с помощью PMP из грейпфрута, загруженными доксорубицином (PMP-DOX), из **примера 23b**.

Штаммы бактерий и дрожжевых грибов поддерживали, как указано поставщиком: *E. coli* (ATCC, № 25922) выращивали на триптиказо-соевом агаре/бульоне при 37°C, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) выращивали на триптическом соевом агаре/бульоне с 50 мг/мл рифампицина при 37°C, а *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC, № 9763) выращивали на бульоне дрожжевого экстракта пептон-декстрозы (YPD) и поддерживали при 30°C. Перед обработкой свежие однодневные культуры выращивали в течение ночи, OD (600 нм) перед использованием доводили до 0,1 OD с помощью среды и бактерии/дрожжевые грибы переносили в 96-луночный планшет для обработки (образцы в двух повторностях, 100 мкл/лунка). Бактерии/дрожжевые грибы обрабатывали 50 мкл раствора PMP-DOX в ультрачистой воде до эффективной концентрации DOX, составляющей 0 (отрицательный контроль), 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ (конечный объем на лунку составил 150 мкл). Планшеты закрывали алюминиевой фольгой, и инкубировали при 37°C (*E. coli*, *P. aeruginosa*) или 30°C (*S. cerevisiae*), и перемешивали при 220 об./мин.

Измерение кинетики поглощения при 600 нм выполняли на спектрофотометре SpectraMax® для контроля OD культур при t=0 ч, t=1 ч, t=2 ч, t=3 ч, t=4,5 ч, t=16 ч (*E. coli*, *P. aeruginosa*) или t=0,5 ч, t=1,5 ч, t=2,5 ч, t=3,5 ч, t=4 ч, t=16 ч (*S. cerevisiae*). Поскольку доксорубицин имеет широкий спектр флуоресценции, который частично переходит в поглощение при 600 нм при высокой концентрации DOX, то все значения OD для терапевтической дозы сначала нормализовали до OD первого момента времени для этой дозы (t=0 для *E. coli*, *P. aeruginosa*, t=0,5 для *S. cerevisiae*). Для сравнения цитотоксического действия обработки с помощью PMP-DOX на различные штаммы бактерий и дрожжевых грибов, в каждой группе обработки определяли относительную OD по сравнению с необработанным контролем (принятым за 100%). Все исследуемые виды микроорганизмов продемонстрировали различную степень цитотоксичности,

индуцированной PMP-DOX (фиг. 10F-10I), которая являлась дозозависимой, за исключением *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* был наиболее чувствительным к PMP-DOX, проявляя цитотоксический ответ уже через 2,5 часа обработки и достигая IC50 при наиболее низкой протестированной эффективной дозе (5 мкМ) через 16 часов после обработки, являясь в 10х более чувствительным, чем любой другой исследуемый микроорганизм в этой серии. Через 3 часа после обработки *E. coli* достигал IC50 только в случае 100 мкМ. *P. aeruginosa* был наименее чувствительным к PMP-DOX, демонстрируя максимальное снижение роста, составлявшее 37%, при эффективных дозах DOX, составлявших 50 и 100 мкМ. Также авторы настоящего изобретения исследовали свободный доксорубин и обнаружили, что при тех же дозах цитотоксичность индуцировалась раньше, чем при доставке в виде PMP-DOX. Это указывало на то, что низкомолекулярное соединение, представляющее собой доксорубин, легко диффундировало в одноклеточные организмы, по сравнению с PMP с липидной мембраной, которые для высвобождения своего груза должны были пересечь клеточную стенку микроорганизма и слиться с мембранами целевых клеток, либо непосредственно с цитоплазматической мембраной, либо с эндосомной мембраной после эндоцитозного поглощения.

Данные авторов настоящего изобретения показали, что PMP, загруженные низкомолекулярным соединением, могли отрицательно влиять на приспособленность различных бактерий и дрожжевых грибов.

Пример 24. Обработка микроорганизма с помощью PMP, загруженных белком

В этом примере продемонстрировано, что PMP можно экзогенно загружать белком, PMP могут защищать свой груз от разрушения, и PMP могут доставлять свой функциональный груз в организм. В этом примере PMP из грейпфрута применяли в качестве модельного PMP, бактерию *Pseudomonas aeruginosa* использовали в качестве модельного организма, и белок люциферазу использовали в качестве модельного белка.

В то время как препараты на основе белков и пептидов обладают огромными возможностями влияния на приспособленность широкого спектра патогенных бактерий и грибов, которые являются устойчивыми или трудно поддаются лечению, их применение было неудачным из-за их нестабильности и проблем, касающихся составления.

а) Загрузка белка люциферазы в PMP из грейпфрута

PMP из грейпфрута получали, как описано в **примере 10а**. Белок люциферазу (Luc) приобретали в LSBio (№ по каталогу LS-G5533-150) и растворяли в PBS, pH 7,4 до конечной концентрации 300 мкг/мл. Стерилизованные фильтрованием PMP загружали белком люциферазой путем электропорации с применением протокола, основанного на Rachael W. Sirianni и Bahareh Behkam (eds.), Targeted Drug Delivery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1831. Отдельно PMP (контроль PMP), отдельно белок люциферазу (контроль белка) или PMP+белок люциферазу (PMP, загруженные белком) смешивали с 4,8х буфером для электропорации (100% Optiprep (Sigma, D1556) в ультрачистой воде) с получением конечной концентрации Optiprep, составляющей 21%, в

реакционной смеси (см. таблицу 3). Контроль белка получали путем смешивания белка люциферазы с ультрачистой водой вместо Optiprep (контроль белка), поскольку конечный осадок PMP-Luc разбавляли водой. Образцы переносили в охлажденные кюветы и подвергали электропорации при 0,400 кВ, 125 мкФ (0,125 мФ), при сопротивлении от низкого 100 Ω до высокого 600 Ω с двумя импульсами (4-10 мс) с применением Biorad GenePulser®. Реакционную смесь помещали на лед на 10 минут и переносили в предварительно охлажденную льдом ультрацентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Все образцы, содержащие PMP, промывали 3 раза, добавляя 1,4 мл ультрачистой воды, после чего подвергали ультрацентрифугированию (100000 x g в течение 1,5 ч. при 4°C). Конечный осадок ресуспендировали в минимальном объеме ультрачистой воды (50 мкл) и хранили при 4°C до использования. После электропорации образцы, содержащие только белок люциферазу, не промывали путем центрифугирования и хранили при 4°C до использования.

Для определения загрузочной способности PMP использовали один микролитр PMP, загруженных люциферазой (PMP-Luc), и один микролитр незагруженных PMP. Для определения количества белка люциферазы, загруженного в PMP, строили стандартную кривую для белка люциферазы (LSBio, LS-G5533-150) (10, 30, 100, 300 и 1000 нг). Активность люциферазы во всех образцах и стандартах анализировали с применением набора для анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega, E6110) и измеряли люминесценцию с помощью спектрофотометра SpectraMax®. Количество белка люциферазы, загруженного в PMP, определяли с применением стандартной кривой для белка люциферазы (LSBio, LS-G5533-150) и нормализовали по люминесценции в образце незагруженных PMP. Загрузочная способность (нг белка люциферазы на 1E+9 частиц) рассчитывали в виде концентрации белка люциферазы (нг), деленной на количество загруженных PMP (PMP-Luc). Загрузочная способность PMP-Luc составляла 2,76 нг белка люциферазы/1×10⁹ PMP.

Результаты авторов настоящего изобретения показали, что PMP можно загружать модельным белком, который остается активным после инкапсуляции.

Таблица 3. Стратегия загрузки белка люциферазы с применением электропорации

	PMP с люциферазой (PMP, загруженные белком)	Люцифераза (контроль белка)	PMP (контроль PMP)
Белок люциферазы (300 мкг/мл (мкл)	25	25	0
Optiprep 100% (мкл)	14,7	0	14,7
Ультрачистая вода (мкл)	10,3	45	35,3
PMP GF (исходный раствор)	20	0	20

РМР=7,56x10¹² РМР/мл)			
Конечный объем	70	70	70

Примечание: 25 мкл люциферазы эквивалентно 7,5 мкг белка люциферазы.

b) Обработка Pseudomonas aeruginosa с помощью РМР из грейпфрута, загруженных белком люциферазой

Pseudomonas aeruginosa (АТСС) выращивали в течение ночи при 30° в триптическом соевом бульоне с добавлением 50 мкг/мл рифампицина в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки Pseudomonas aeruginosa (общий объем 5 мл) собирали путем центрифугирования при 3000 x g в течение 5 мин. Клетки дважды промывали с помощью 10 мл 10 mM MgCl₂ и ресуспендировали в 5 мл 10 mM MgCl₂. OD600 измеряли и доводили до 0,5.

Обработки проводили в двух повторностях в пробирках Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащих 50 мкл ресуспендированных клеток Pseudomonas aeruginosa с добавлением 3 нг РМР-Лус (разведенных в ультрачистой воде), 3 нг свободного белка люциферазы (контроль, содержащий только белок; разбавленный в ультрачистой воде) или ультрачистой воды (отрицательный контроль). Во все образцы добавляли ультрачистую воду до 75 мкл. Образцы смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. и накрывали алюминиевой фольгой. Затем образцы центрифугировали при 6000 x g в течение 5 мин. и 70 мкл супернатанта собирали и сохраняли для обнаружения люциферазы. Затем бактериальный осадок трижды промывали с помощью 500 мкл 10 mM MgCl₂, содержащего 0,5% Triton X-100, для удаления/разрушения РМР, которые не были захвачены. Последнюю промывку с помощью 1 мл 10 mM MgCl₂ проводили для удаления остаточного Triton X-100. Удаляли 970 мкл супернатанта (оставив осадок в 30 мкл промывочного буфера) и добавляли 20 мкл 10 mM MgCl₂ и 25 мкл ультрачистой воды для ресуспендирования осадков Pseudomonas aeruginosa. Содержание белка люциферазы измеряли по люминесценции с применением набора для анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega, E6110) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы (образцы бактериального осадка и супернатанта) инкубировали в течение 10 минут и измеряли люминесценцию на спектрофотометре SpectraMax®. Pseudomonas aeruginosa, обработанные РМР из грейпфрута, загруженными белком люциферазой, характеризовались экспрессией люциферазы, в 19,3 раза более высокой чем при обработке отдельно свободным белком люциферазой или контролем, представляющим собой ультрачистую воду, (отрицательный контроль), что указывало на то, что РМР способны эффективно доставлять свой белковый груз в бактерии (фиг. 11). Кроме того, РМР, по-видимому, защищали белок люциферазу от разрушения, поскольку уровни свободного белка люциферазы как в супернатанте, так и в бактериальных осадках были очень низкими. Учитывая, что терапевтическая доза составляла 3 нг белка люциферазы, на основе стандартной кривой для белка люциферазы, свободный белок люциферазу в супернатанте или бактериальных осадках после 2 часов инкубации при к. т. в воде составлял <0,1 нг белка люциферазы, что указывало на разрушение белка.

Данные авторов настоящего изобретения показали, что РМР могут доставлять белковый груз в организмы и что РМР могут защищать свой груз от разрушения в окружающей среде.

Другие варианты осуществления

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения находятся в следующих пронумерованных абзацах.

1. Композиция для контроля патогенов, содержащая совокупность РМР, где каждый РМР из совокупности РМР содержит гетерологичное средство для контроля патогенов, и где композиция составлена для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его переносчику.

2. Композиция для контроля патогенов по пункту 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой противобактериальное средство, противогрибковое средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство против насекомых.

3. Композиция для контроля патогенов по пункту 2, где противобактериальное средство представляет собой доксорубицин.

4. Композиция для контроля патогенов по пункту 2, где противобактериальное средство представляет собой антибиотик.

5. Композиция для контроля патогенов по пункту 4, где антибиотик представляет собой ванкомицин.

6. Композиция для контроля патогенов по пункту 4, где антибиотик представляет собой пенициллин, цефалоспорин, монобактам, карбапенем, макролид, аминогликозид, хинолон, сульфонамид, тетрациклин, гликопептид, липогликопептид, оксазолидинон, рифамицин, туберактиномицин, хлорамфеникол, метронидазол, тинидазол, нитрофурантоин, тейкопланин, телаванцин, линезолид, циклосерин 2, бацитрацин, полимиксин В, виомицин или капреомицин.

7. Композиция для контроля патогенов по пункту 2, где противогрибковое средство представляет собой аллиламин, имидазол, триазол, тиазол, полиен или эхинокандин.

8. Композиция для контроля патогенов по пункту 2, где инсектицидное средство представляет собой хлорникотинил, неоникотиноид, карбамат, фосфорорганическое соединение, пиретроид, оксадиазин, спинозин, циклодиен, хлорорганическое соединение, фипрол, мектин, диацилгидразин, бензоилмочевину, оловоорганическое соединение, пиррол, динитротерпенол, МЕТП, тетрановую кислоту, тетрамовую кислоту или фталамид.

9. Композиция для контроля патогенов по пункту 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту или полипептид.

10. Композиция для контроля патогенов по пункту 9, где низкомолекулярное соединение представляет собой антибиотик или вторичный метаболит.

11. Композиция для контроля патогенов по пункту 9, где нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК.

12. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-11, где гетерологичное средство для контроля патогенов инкапсулировано каждым РМР из совокупности РМР.

13. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-11, где гетерологичное средство для контроля патогенов встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР.

14. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-11, где гетерологичное средство для контроля патогенов конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР.

15. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-14, где каждый РМР из совокупности РМР дополнительно содержит дополнительное средство для контроля патогенов.

16. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-15, где патоген представляет собой бактерию, грибок, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

17. Композиция для контроля патогенов по пункту 16, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

18. Композиция для контроля патогенов по пункту 17, где вид *Pseudomonas* представляет собой *Pseudomonas aeruginosa*.

19. Композиция для контроля патогенов по пункту 17, где вид *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*.

20. Композиция для контроля патогенов по пункту 16, где грибок представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

21. Композиция для контроля патогенов по пункту 16, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.

22. Композиция для контроля патогенов по пункту 16, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.

23. Композиция для контроля патогенов по пункту 16, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.

24. Композиция для контроля патогенов по пункту 1, где переносчик представляет собой насекомое.

25. Композиция для контроля патогенов по пункту 24, где переносчик представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

26. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-25, где композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или является стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C.

27. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-26, где РМР

являются стабильными в течение по меньшей мере 24 часов, 48 часов, семи дней или 30 дней при 4°C.

28. Композиция для контроля патогенов по пункту 27, где РМР являются стабильными при температуре по меньшей мере 20°C, 24°C или 37°C.

29. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-23 или пунктов 26-28, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для обеспечения снижения приспособленности патогена животного.

30. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-15 или пунктов 24-28, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для обеспечения снижения приспособленности переносчика патогена животного.

31. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-23 или пунктов 26-30, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для лечения инфекции у животного, инфицированного патогеном.

32. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-23 или пунктов 26-30, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования патогеном.

33. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-32, где совокупность РМР представлена в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,01 нг, 0,1 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг, 250 нг, 500 нг, 750 нг, 1 мкг, 10 мкг, 50 мкг, 100 мкг или 250 мкг белка РМР/мл.

34. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-33, где композиция содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

35. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-34, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

36. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-35, где композиция составлена для стабилизации РМР.

37. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-36, где композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

38. Композиция для контроля патогенов по любому из пунктов 1-37, где композиция содержит по меньшей мере 5% РМР.

39. Композиция для контроля патогенов, содержащая совокупность РМР, где РМР выделены из растения с помощью способа, который предусматривает стадии:

(а) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV;

(б) выделения фракции неочищенных РМР из исходного образца, где фракция неочищенных РМР характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(с) очистки фракции неочищенных РМР с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV;

(d) загрузки совокупности РМР из стадии (с) средством для контроля патогенов и

(е) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его переносчику.

40. Патоген животного, содержащий композицию для контроля патогенов по любому из пунктов 1-39.

41. Переносчик патогена животного, содержащий композицию для контроля патогенов по любому из пунктов 1-40.

42. Способ доставки композиции для контроля патогенов животному, включающий введение животному композиции по любому из пунктов 1-39.

43. Способ лечения инфекции у животного, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение животному эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-39.

44. Способ предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования, при этом способ включает введение животному эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-39, где способ снижает вероятность инфицирования животного по сравнению с необработанным животным.

45. Способ по любому из пунктов 42-44, где инфекция вызвана патогеном, и при этом патоген представляет собой бактерию, грибок, вирус, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

46. Способ по пункту 45, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

47. Способ по пункту 45, где грибок представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

48. Способ по пункту 45, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.

49. Способ по пункту 45, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.

50. Способ по пункту 45, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.

51. Способ по любому из пунктов 42-50, где композицию для контроля патогенов вводят животному перорально, внутривенно или подкожно.

52. Способ доставки композиции для контроля патогенов по отношению к патогену, включающий приведение патогена в контакт с композицией по любому из пунктов 1-39.

53. Способ снижения приспособленности патогена, при этом способ включает доставку по отношению к патогену композиции по любому из пунктов 1-39, где способ снижает приспособленность патогена по сравнению с необработанным патогеном.

54. Способ по пункту 52 или пункту 53, где способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, в которой патоген растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение.

55. Способ по любому из пунктов 52-54, где композицию доставляют в виде пригодной для питания патогена композиции для поглощения патогеном.

56. Способ по любому из пунктов 52-55, где патоген представляет собой бактерию, гриб, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

57. Способ по пункту 56, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

58. Способ по пункту 56, где гриб представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

59. Способ по пункту 56, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.

60. Способ по пункту 56, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.

61. Способ по пункту 56, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.

62. Способ по любому из пунктов 52-61, где композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

63. Способ снижения приспособленности переносчика патогена животного, при этом способ включает доставку по отношению к переносчику эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-39, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.

64. Способ по пункту 63, где способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, в которой переносчик растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение.

65. Способ по пункту 63 или пункту 64, где композицию доставляют в виде пригодной для питания композиции для поглощения переносчиком.

66. Способ по любому из пунктов 63-65, где переносчик представляет собой насекомое.

67. Способ по пункту 66, где насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

68. Способ по любому из пунктов 63-67, где композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

69. Способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ

включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

70. Способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противогрибковое средство.

71. Способ по пункту 70, где противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена гриба, вызывающего грибковую инфекцию.

72. Способ по пункту 71, где ген представляет собой ген белка усиленного роста нитевидной формы (EFG1).

73. Способ по любому из пунктов 70-72, где грибковая инфекция вызвана *Candida albicans*.

74. Способ по любому из пунктов 70-73, где композиция представляет собой композицию, которая содержит РМР, полученный из растения рода *Arabidopsis*.

75. Способ по любому из пунктов 70-74, где способ снижает или в значительной степени устраняет грибковую инфекцию.

76. Способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

77. Способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противобактериальное средство.

78. Способ по пункту 77, где противобактериальное средство представляет собой амфотерицин В.

79. Способ по пункту 77 или пункту 78, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

80. Способ по любому из пунктов 77-79, где композиция представляет собой композицию, которая содержит РМР, полученный из растения рода *Arabidopsis*.

81. Способ по любому из пунктов 77-80, где способ снижает или значительно устраняет бактериальную инфекцию.

82. Способ по любому из пунктов 69-81, где животное представляет собой или животное, подлежащее ветеринарному лечению, или животное, относящееся к домашнему скоту.

83. Способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

84. Способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ

включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит инсектицидное средство.

85. Способ по пункту 84, где инсектицидное средство представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту.

86. Способ по любому из пунктов 83-85, где паразитическое насекомое представляет собой постельного клопа.

87. Способ по любому из пунктов 83-86, где способ снижает приспособленность паразитического насекомого по сравнению с необработанным паразитическим насекомым.

88. Способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

89. Способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит нематоцидное средство.

90. Способ по пункту 88 или пункту 89, где паразитическая нематода представляет собой *Heligmosomoides polygyrus*.

91. Способ по любому из пунктов 88-90, где способ снижает приспособленность паразитической нематоды по сравнению с необработанной паразитической нематодой.

92. Способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

93. Способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противопаразитарное средство.

94. Способ по пункту 92 или пункту 93, где паразитическое простейшее представляет собой *T. vaginalis*.

95. Способ по любому из пунктов 92-94, где способ снижает приспособленность паразитического простейшего по сравнению с необработанным паразитическим простейшим.

96. Способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

97. Способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит инсектицидное средство.

98. Способ по пункту 96 или пункту 97, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.

99. Способ по любому из пунктов 96-98, где насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было достаточно подробно описано с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, описания и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Раскрытия всех источников патентной и научной литературы, цитируемых в данном документе, явным образом включено в их полном объеме посредством ссылки.

Другие варианты осуществления представлены в формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для контроля патогенов, содержащая совокупность РМР, где каждый РМР из совокупности РМР содержит гетерологичное средство для контроля патогенов, и где композиция составлена для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его переносчику.

2. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой противобактериальное средство, противогрибковое средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство против насекомых.

3. Композиция для контроля патогенов по п. 2, где противобактериальное средство представляет собой доксорубицин.

4. Композиция для контроля патогенов по п. 2, где противобактериальное средство представляет собой антибиотик.

5. Композиция для контроля патогенов по п. 4, где антибиотик представляет собой ванкомицин.

6. Композиция для контроля патогенов по п. 4, где антибиотик представляет собой пенициллин, цефалоспорин, монобактам, карбапенем, макролид, аминогликозид, хинолон, сульфонамид, тетрациклин, гликопептид, липогликопептид, оксазолидинон, рифамицин, туберактиномицин, хлорамфеникол, метронидазол, тинидазол, нитрофурантоин, тейкопланин, телаванцин, линезолид, циклосерин 2, бацитрацин, полимиксин В, виомицин или капреомицин.

7. Композиция для контроля патогенов по п. 2, где противогрибковое средство представляет собой аллиламин, имидазол, триазол, тиазол, полиен или эхинокандин.

8. Композиция для контроля патогенов по п. 2, где инсектицидное средство представляет собой хлорникотинил, неоникотиноид, карбамат, фосфорорганическое соединение, пиретроид, оксадиазин, спинозин, циклодиен, хлорорганическое соединение, фипрол, мектин, диацилгидразин, бензоилмочевину, оловоорганическое соединение, пиррол, динитротерпенол, МЕТІ, тетрановую кислоту, тетрамовую кислоту или фталамид.

9. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов представляет собой низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту или полипептид.

10. Композиция для контроля патогенов по п. 9, где низкомолекулярное соединение представляет собой антибиотик или вторичный метаболит.

11. Композиция для контроля патогенов по п. 9, где нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК.

12. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов инкапсулировано каждым РМР из совокупности РМР.

13. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где гетерологичное средство для

контроля патогенов встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР.

14. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где гетерологичное средство для контроля патогенов конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР.

15. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где каждый РМР из совокупности РМР дополнительно содержит дополнительное средство для контроля патогенов.

16. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где патоген представляет собой бактерию, гриб, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

17. Композиция для контроля патогенов по п. 16, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

18. Композиция для контроля патогенов по п. 17, где вид *Pseudomonas* представляет собой *Pseudomonas aeruginosa*.

19. Композиция для контроля патогенов по п. 17, где вид *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*.

20. Композиция для контроля патогенов по п. 16, где гриб представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

21. Композиция для контроля патогенов по п. 16, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.

22. Композиция для контроля патогенов по п. 16, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.

23. Композиция для контроля патогенов по п. 16, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.

24. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где переносчик представляет собой насекомое.

25. Композиция для контроля патогенов по п. 24, где переносчик представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

26. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или является стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C.

27. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где РМР являются стабильными в течение по меньшей мере 24 часов, 48 часов, семи дней или 30 дней при 4°C.

28. Композиция для контроля патогенов по п. 27, где РМР являются стабильными при температуре, составляющей по меньшей мере 20°C, 24°C или 37°C.

29. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для обеспечения снижения приспособленности патогена животного.

30. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для обеспечения снижения приспособленности переносчика патогена животного.

31. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для лечения инфекции у животного, инфицированного патогеном.

32. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации, эффективной для предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования патогеном.

33. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где совокупность РМР в композиции представлена в концентрации 0,01 нг, 0,1 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг, 250 нг, 500 нг, 750 нг, 1 мкг, 10 мкг, 50 мкг, 100 мкг или 250 мкг белка РМР/мл.

34. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

35. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

36. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция составлена для стабилизации РМР.

37. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

38. Композиция для контроля патогенов по п. 1, где композиция содержит по меньшей мере 5% РМР.

39. Композиция для контроля патогенов, содержащая совокупность РМР, где РМР выделены из растения с помощью способа, который предусматривает стадии:

(а) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV;

(б) выделения фракции неочищенных РМР из исходного образца, где фракция неочищенных РМР характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(с) очистки фракции неочищенных РМР с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV;

(d) загрузки совокупности РМР из стадии (с) средством для контроля патогенов и

(е) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к патогену сельскохозяйственного животного или животного, подлежащего ветеринарному лечению, или его переносчику.

40. Патоген животного, содержащий композицию для контроля патогенов по п. 1.

41. Переносчик патогена животного, содержащий композицию для контроля патогенов по п. 1.

42. Способ доставки композиции для контроля патогенов по отношению к животному, включающий введение животному композиции по п. 1.

43. Способ лечения инфекции у животного, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение животному эффективного количества композиции по п. 1.

44. Способ предупреждения инфекции у животного, подверженного риску инфицирования, при этом способ включает введение животному эффективного количества композиции по п. 1, где способ снижает вероятность инфицирования животного по сравнению с необработанным животным.

45. Способ по п. 42, где инфекция вызвана патогеном, и при этом патоген представляет собой бактерию, грибок, вирус, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

46. Способ по п. 45, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

47. Способ по п. 45, где грибок представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

48. Способ по п. 45, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.

49. Способ по п. 45, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.

50. Способ по п. 45, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.

51. Способ по п. 42, где композицию для контроля патогенов вводят животному перорально, внутривенно или подкожно.

52. Способ доставки композиции для контроля патогенов по отношению к патогену, включающий приведение патогена в контакт с композицией по п. 1.

53. Способ снижения приспособленности патогена, при этом способ включает доставку по отношению к патогену композиции по п. 1, где способ снижает приспособленность патогена по сравнению с необработанным патогеном.

54. Способ по п. 52, где способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где патоген растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение.

55. Способ по п. 52, где композицию доставляют в виде пригодной для питания патогена композиции для поглощения патогеном.

56. Способ по п. 52, где патоген представляет собой бактерию, грибок, паразитическое насекомое, паразитическую нематоду или паразитическое простейшее.

57. Способ по п. 56, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

58. Способ по п. 56, где грибок представляет собой вид *Saccharomyces* или вид *Candida*.

59. Способ по п. 56, где паразитическое насекомое представляет собой вид *Cimex*.
60. Способ по п. 56, где паразитическая нематода представляет собой вид *Heligmosomoides*.
61. Способ по п. 56, где паразитическое простейшее представляет собой вид *Trichomonas*.
62. Способ по п. 52, где композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.
63. Способ снижения приспособленности переносчика патогена животных, при этом способ включает доставку по отношению к переносчику эффективного количества композиции по п. 1, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.
64. Способ по п. 63, где способ включает доставку композиции по отношению к по меньшей мере одной среде обитания, где переносчик растет, живет, размножается, питается или осуществляет заражение.
65. Способ по п. 63, где композицию доставляют в виде пригодной для питания композиции для поглощения переносчиком.
66. Способ по п. 63, где переносчик представляет собой насекомое.
67. Способ по п. 66, где насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.
68. Способ по п. 63, где композицию доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.
69. Способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.
70. Способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противогрибковое средство.
71. Способ по п. 70, где противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена гриба, вызывающего грибковую инфекцию.
72. Способ по п. 71, где ген представляет собой ген белка усиленного роста нитевидной формы (EFG1).
73. Способ по п. 70, где грибковая инфекция вызвана *Candida albicans*.
74. Способ по п. 70, где композиция содержит РМР, полученный из *Arabidopsis*.
75. Способ по п. 70, где способ снижает или в значительной степени устраняет грибковую инфекцию.
76. Способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

77. Способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противобактериальное средство.

78. Способ по п. 77, где противобактериальное средство представляет собой амфотерицин В.

79. Способ по п. 77, где бактерия представляет собой вид *Pseudomonas*, вид *Escherichia*, вид *Streptococcus*, вид *Pneumococcus*, вид *Shigella*, вид *Salmonella* или вид *Campylobacter*.

80. Способ по п. 77, где композиция содержит РМР, полученный из *Arabidopsis*.

81. Способ по п. 77, где способ снижает или в значительной степени устраняет бактериальную инфекцию.

82. Способ по п. 69, где животное представляет собой или животное, подлежащее ветеринарному лечению, или животное, относящееся к домашнему скоту.

83. Способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

84. Способ снижения приспособленности паразитического насекомого, где способ включает доставку по отношению к паразитическому насекомому композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит инсектицидное средство.

85. Способ по п. 84, где инсектицидное средство представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту.

86. Способ по п. 83, где паразитическое насекомое представляет собой постельного клопа.

87. Способ по п. 83, где способ снижает приспособленность паразитического насекомого по сравнению с необработанным паразитическим насекомым.

88. Способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

89. Способ снижения приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит нематоцидное средство.

90. Способ по п. 88, где паразитическая нематода представляет собой *Heligmosomoides polygyrus*.

91. Способ по п. 88, где способ снижает приспособленность паразитической нематоды по сравнению с необработанной паразитической нематодой.

92. Способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для

контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

93. Способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит противопаразитарное средство.

94. Способ по п. 92, где паразитическое простейшее представляет собой *T. vaginalis*.

95. Способ по п. 92, где способ снижает приспособленность паразитического простейшего по сравнению с необработанным паразитическим простейшим.

96. Способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР.

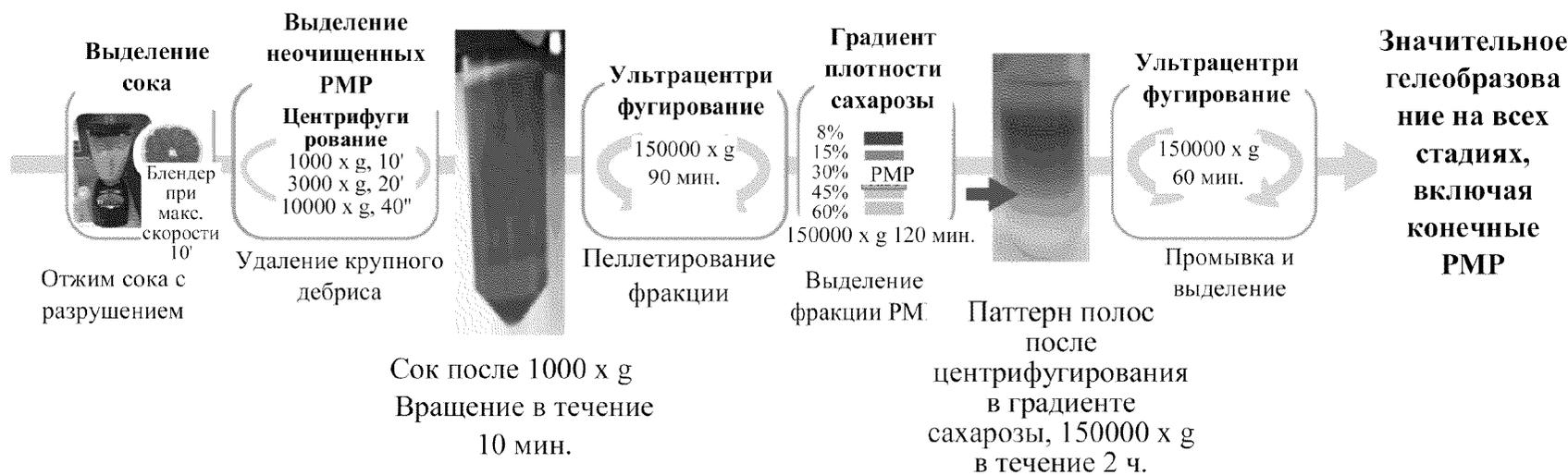
97. Способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции для контроля патогенов, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит инсектицидное средство.

98. Способ по п. 96, где способ снижает приспособленность переносчика по сравнению с необработанным переносчиком.

99. Способ по п. 96, где насекомое представляет собой комара, клеща, микроскопического клеща или вошь.

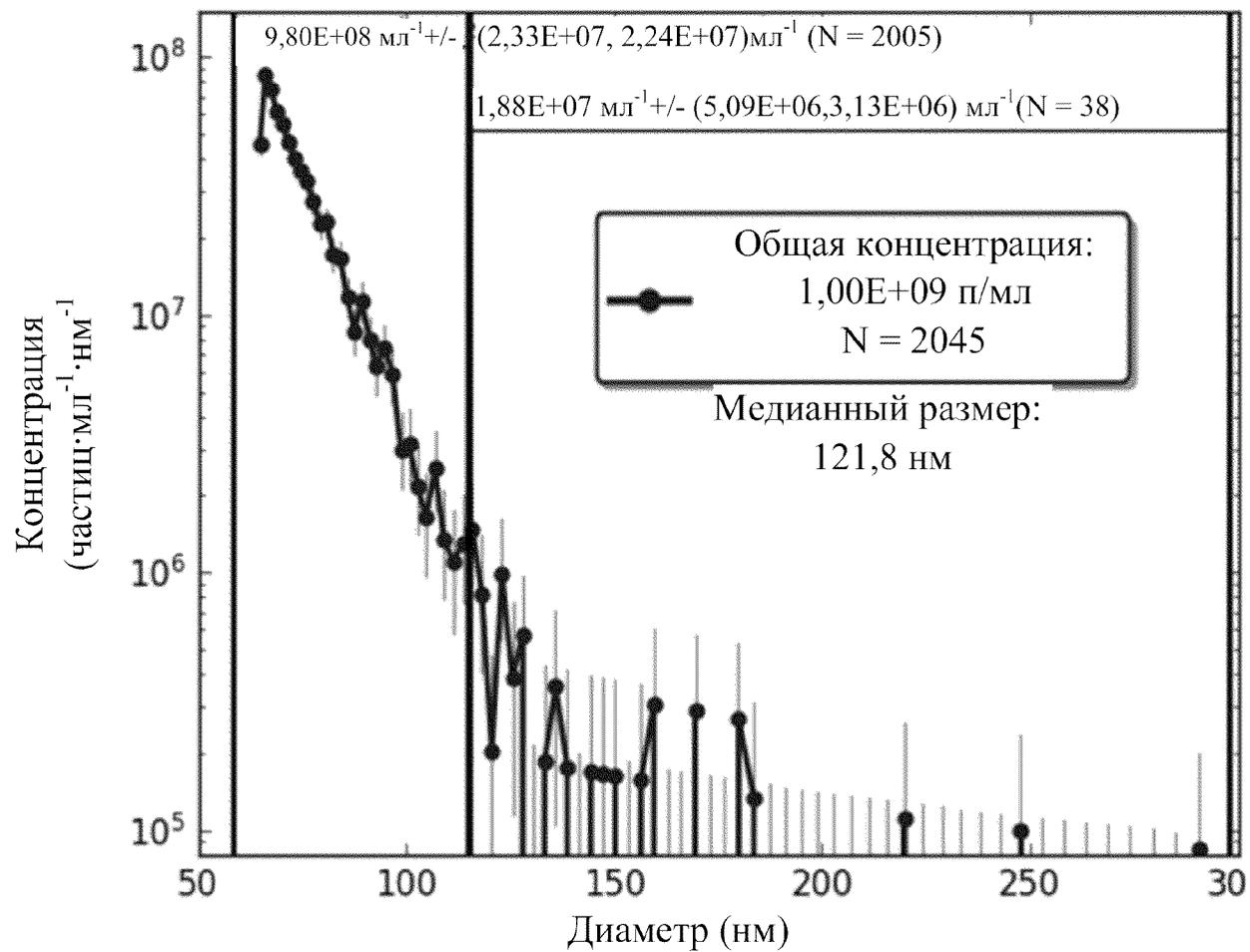
По доверенности

Фиг. 1А



Фиг. 1В

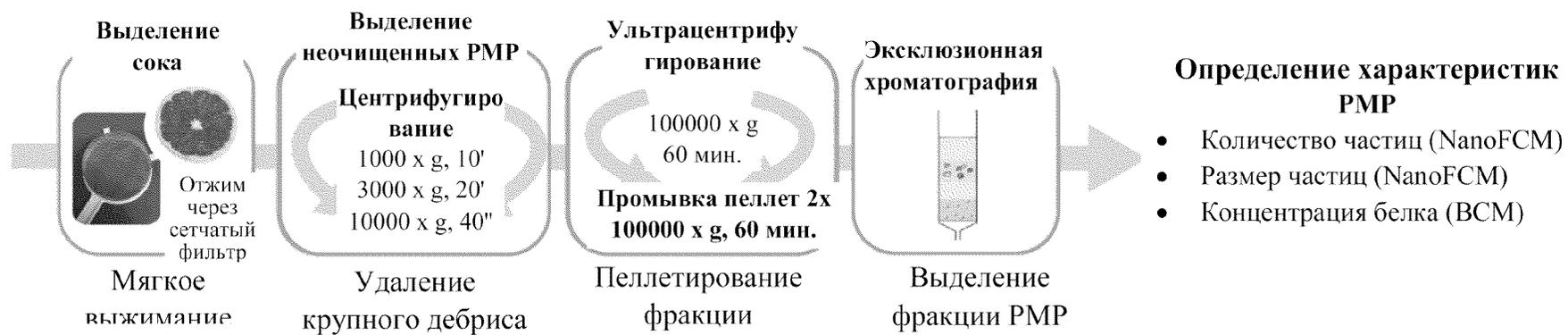
Масштабированные и отфильтрованные РМР18-2



Фиг. 2

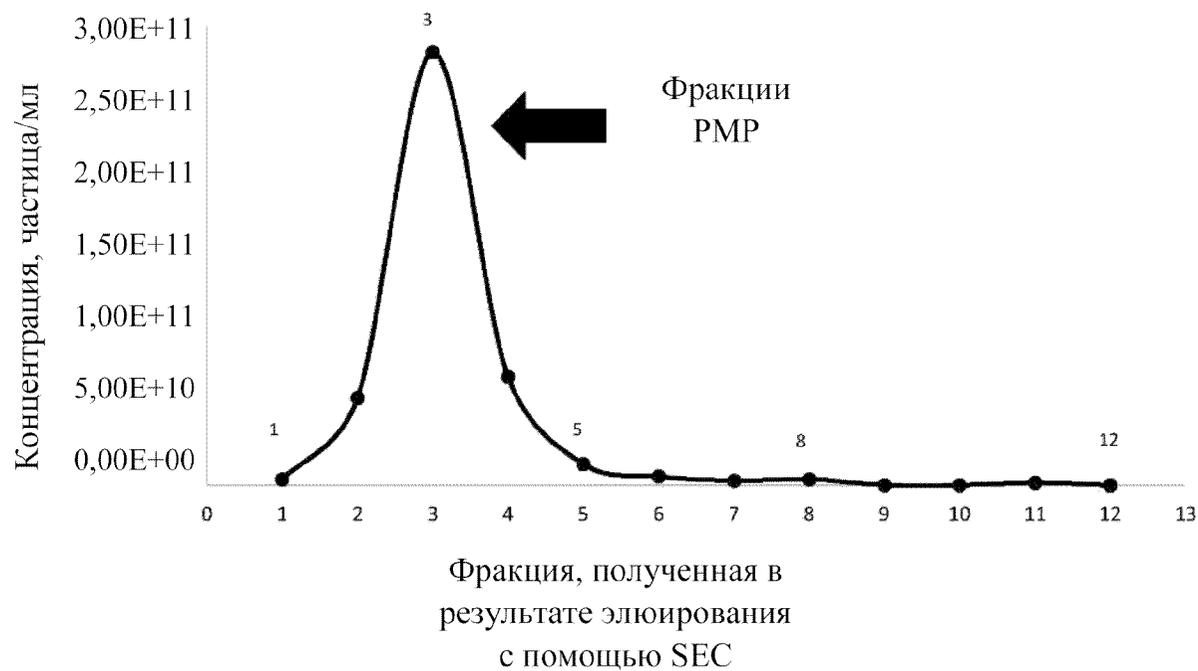


Фиг. 3А



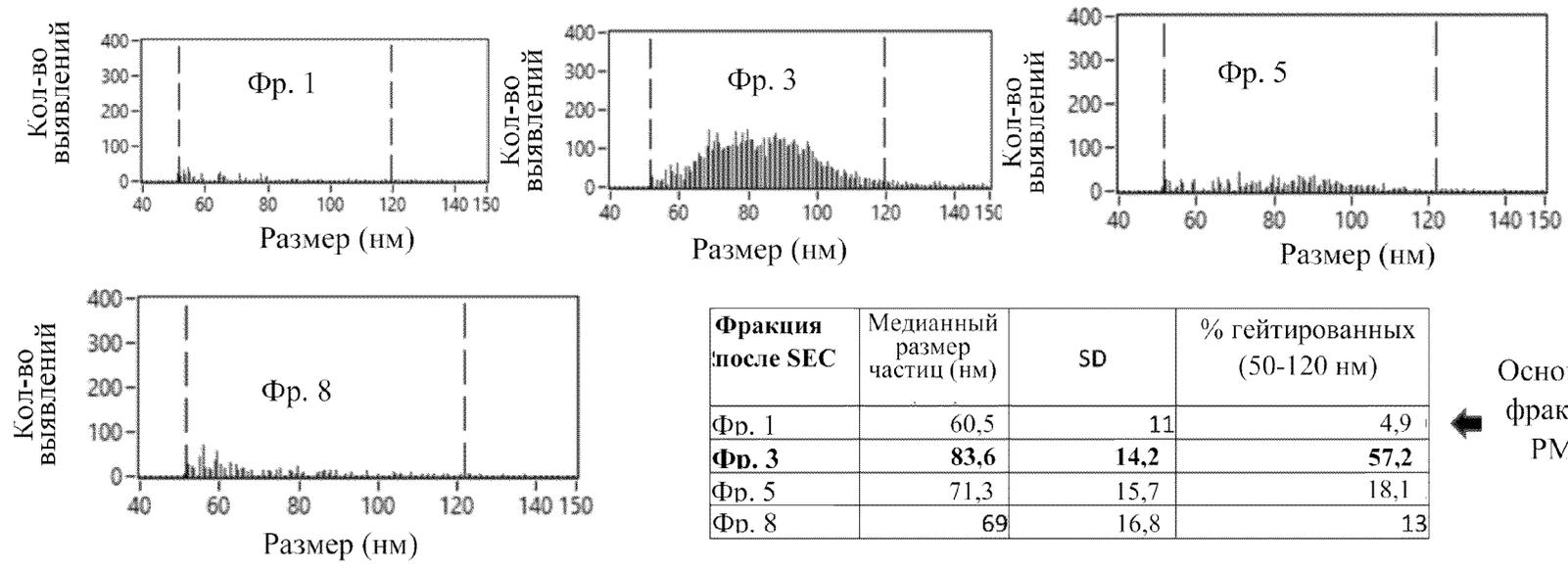
Фиг. 3В

**Концентрация частиц в элюированной фракции после
SEC (NanoFCM)**



Фиг. 3С

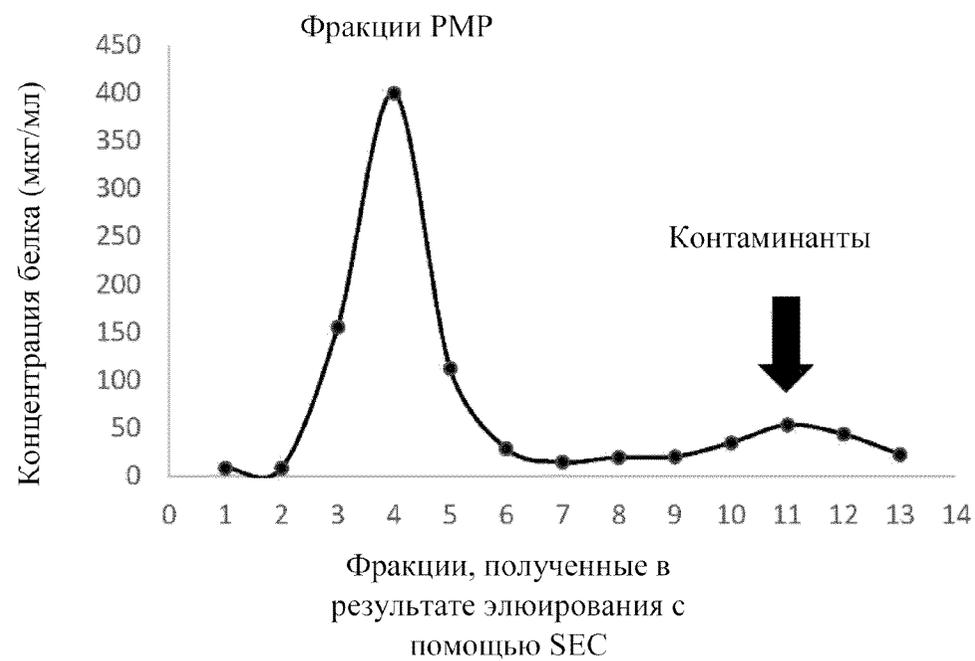
**Распределение частиц по размеру и
средний размер частиц (нм) на фракцию
после SEC (NanoFCM)**



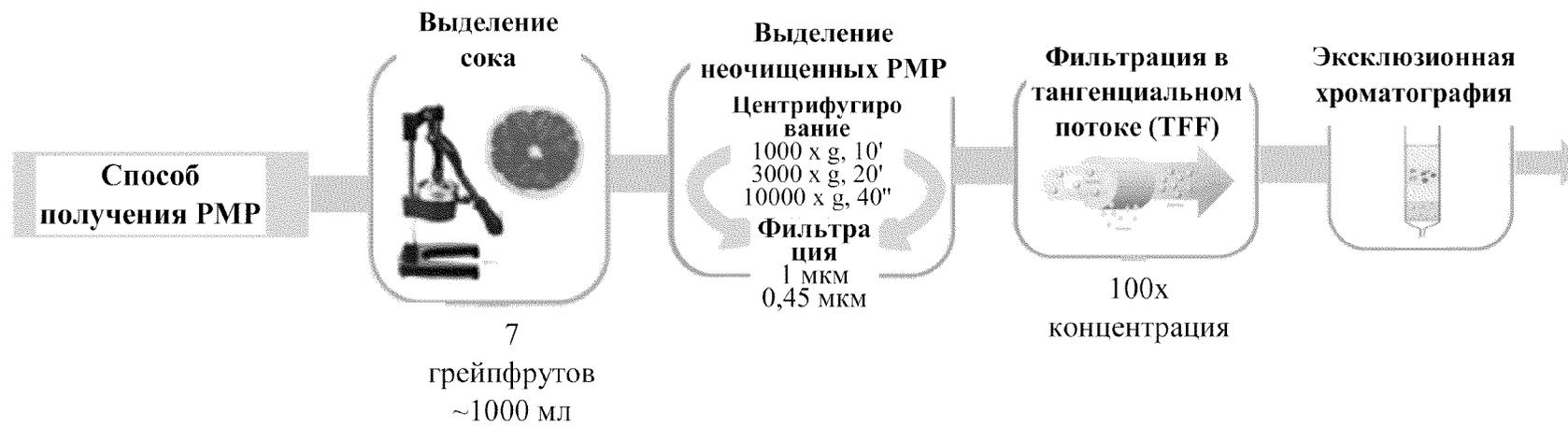
← Основная фракция РМР

Фиг. 3D

Концентрация белка (мкг/мл) в элюированных с помощью SEC фракциях (анализ ВСА)

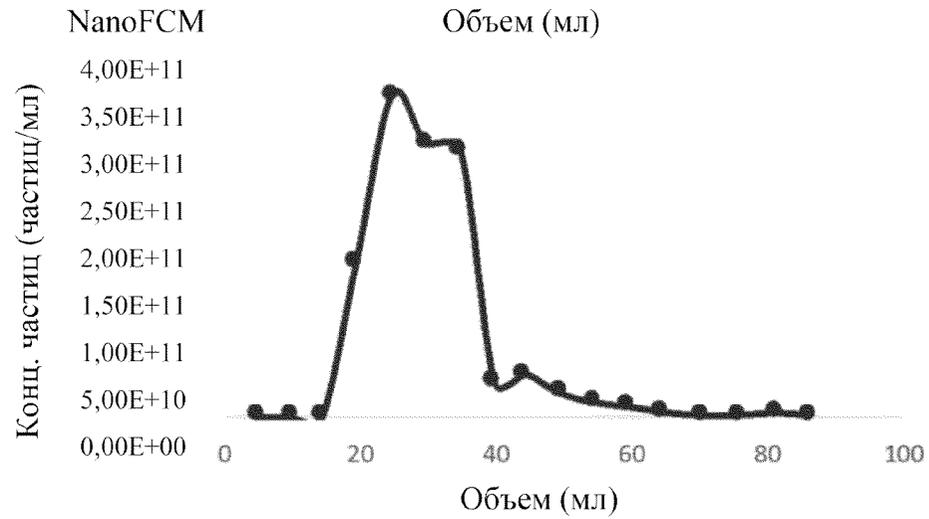
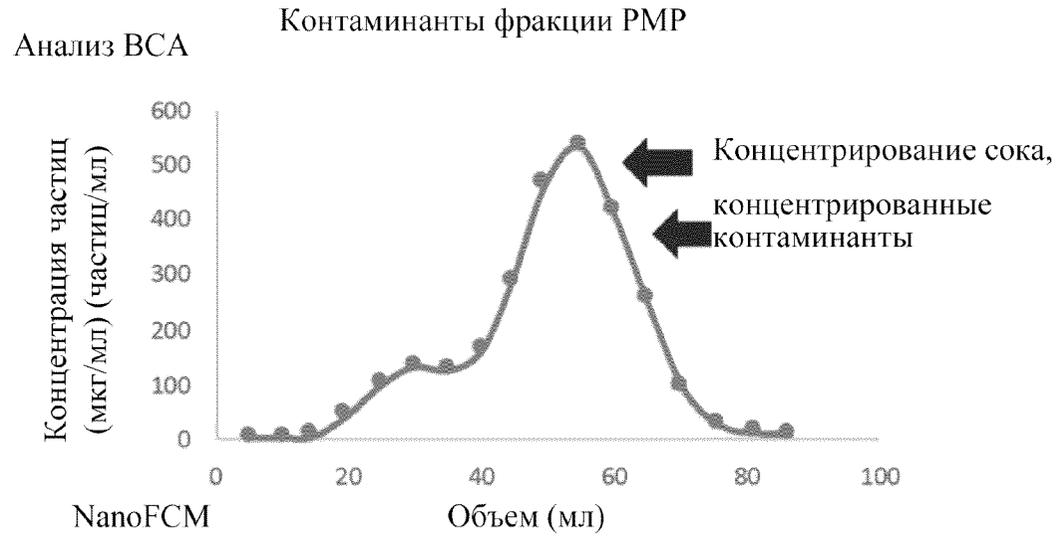


Фиг. 4А



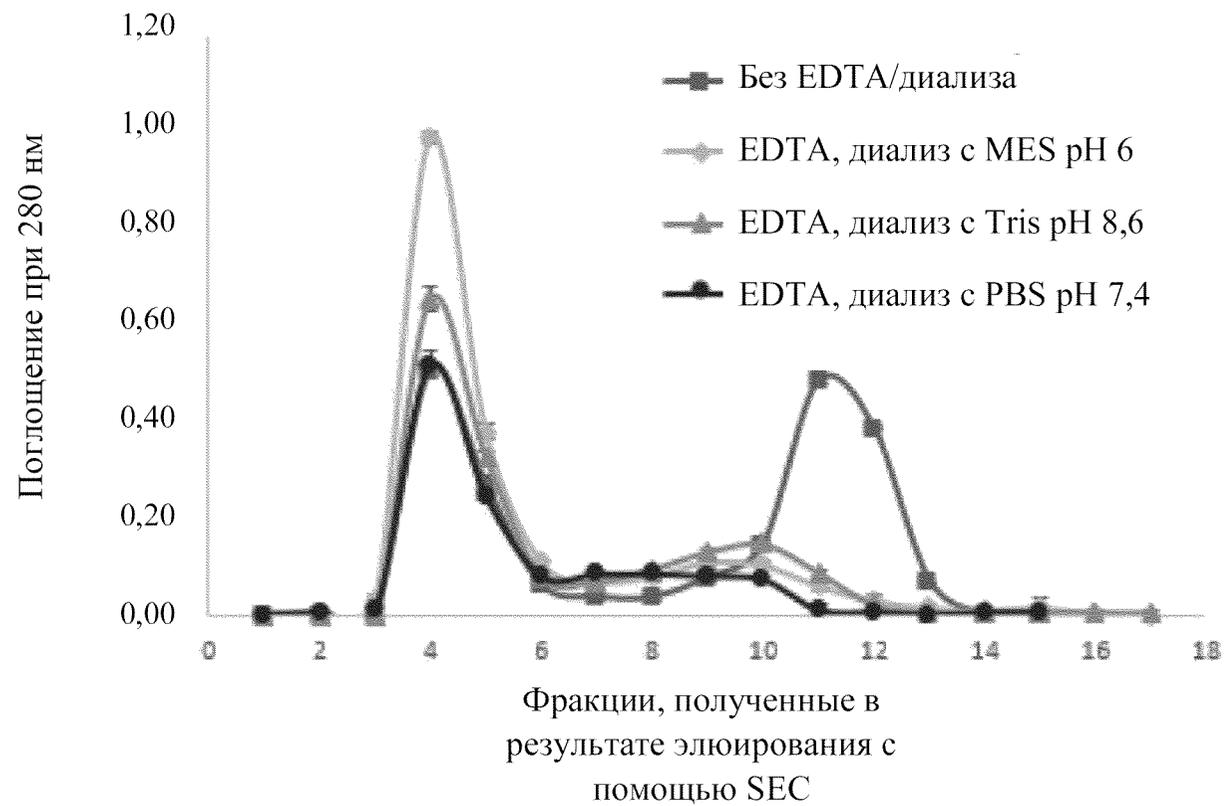
Фиг. 4В

Получение РМР из 1000 мл сока грейпфрута

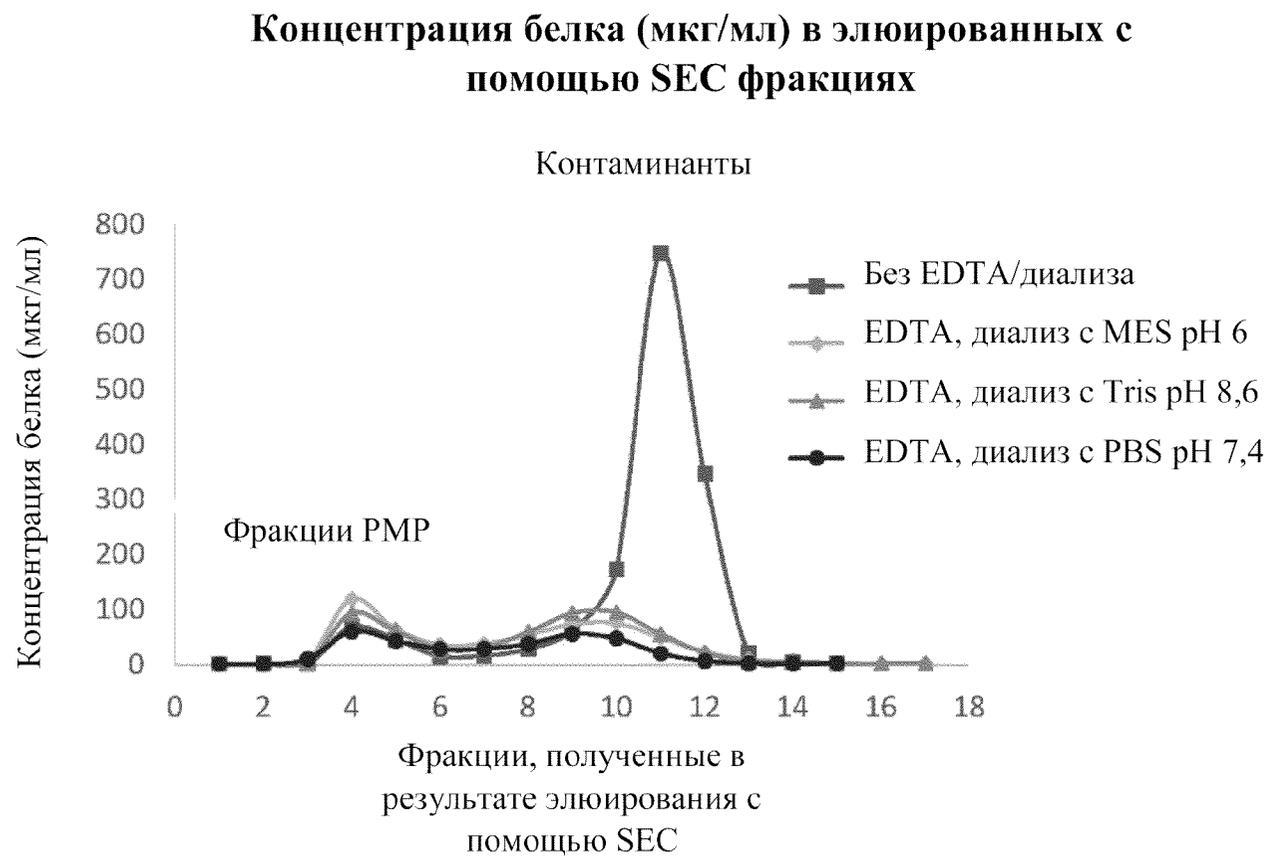


Фиг. 4С

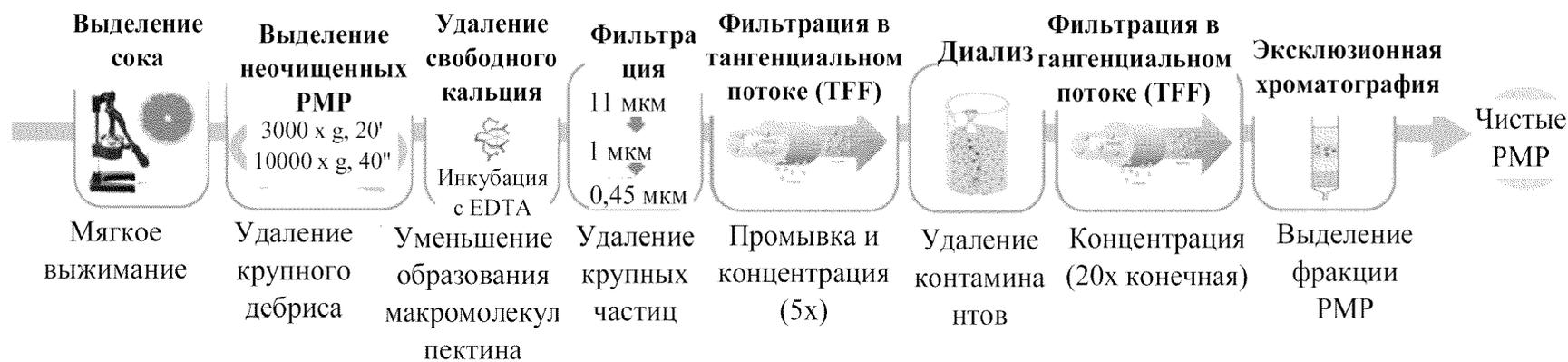
Поглощение при 280 нм (A.U.) элюированными с помощью SEC фракциями



Фиг. 4D

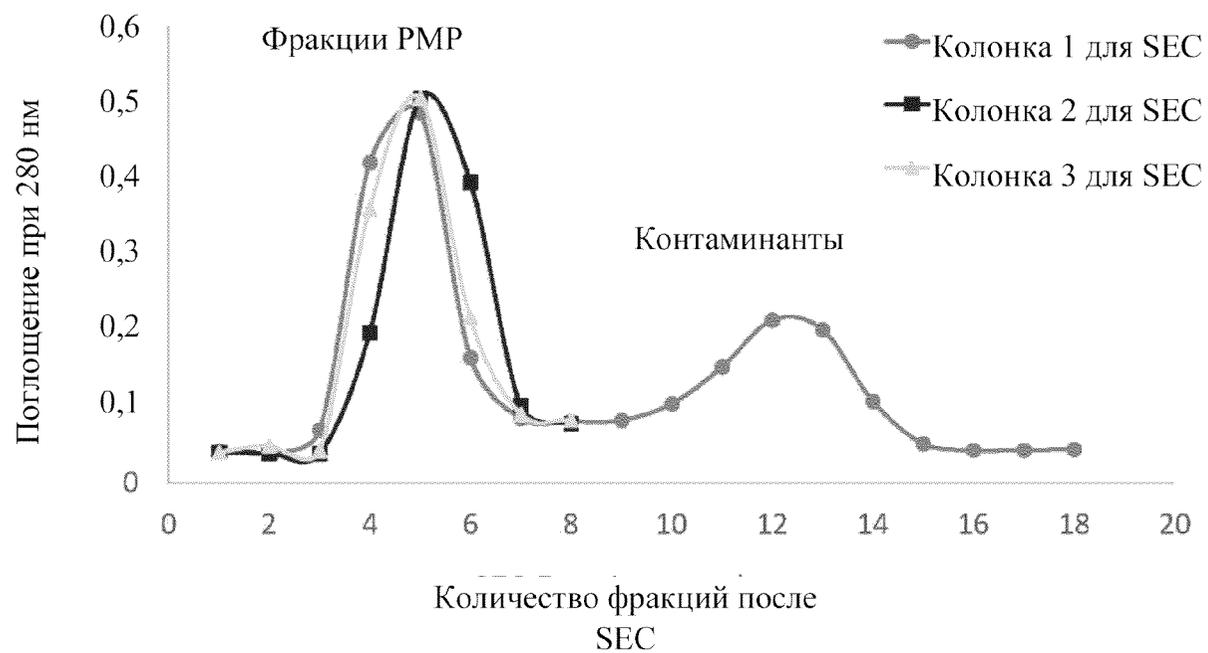


Фиг. 5А



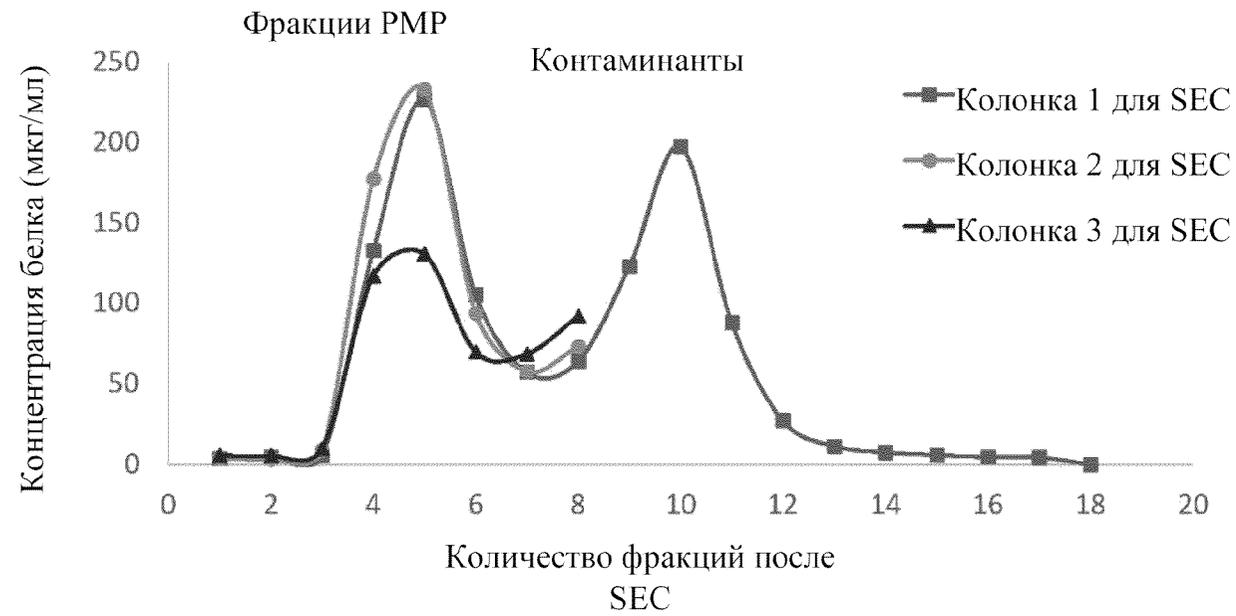
Фиг. 5В

Поглощение при 280 нм (A.U.) элюированными с помощью SEC фракциями грейпфрута



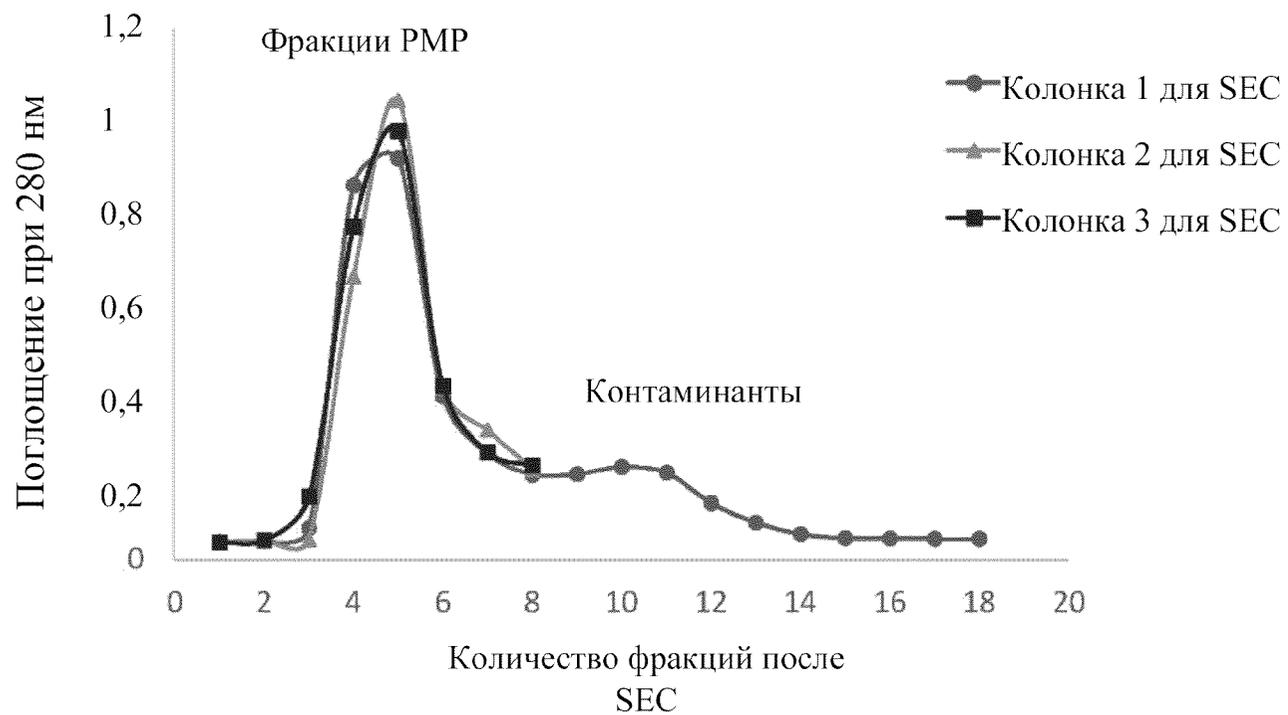
Фиг. 5С

Концентрация белка (мкг/мл) в элюированных с помощью SEC фракциях грейпфрута



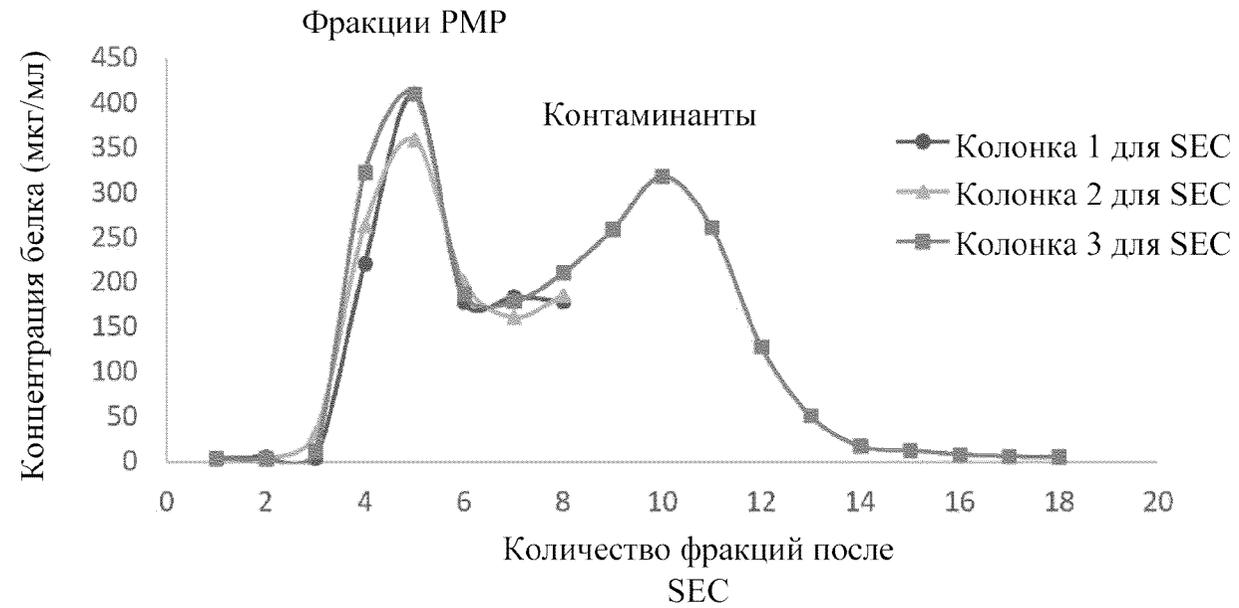
Фиг. 5D

Поглощение при 280 нм (A.U.) элюированными с помощью SEC фракциями лимона



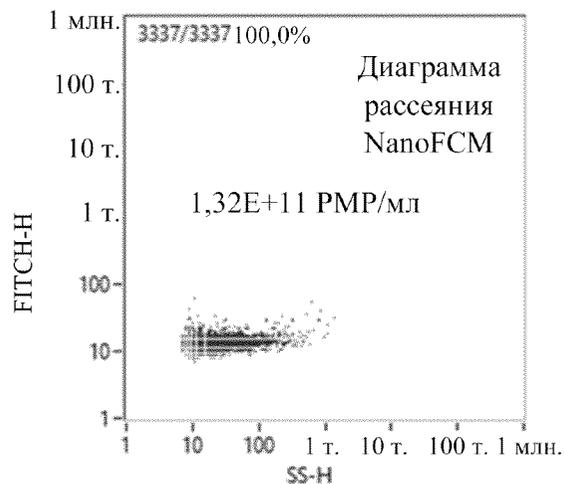
Фиг. 5Е

Концентрация белка (мкг/мл) в элюированных с помощью SEC фракциях лимона

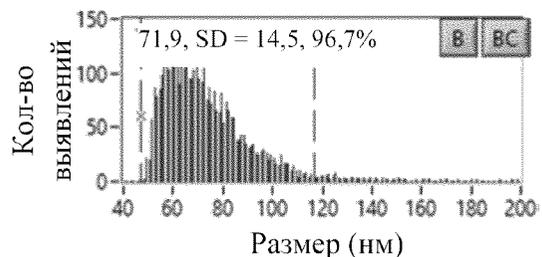


Фиг. 5F

Концентрация РМР грейпфрута в объединенных фракциях после SEC после стерилизации с использованием фильтра с диаметром ячеек 0,22 мкм



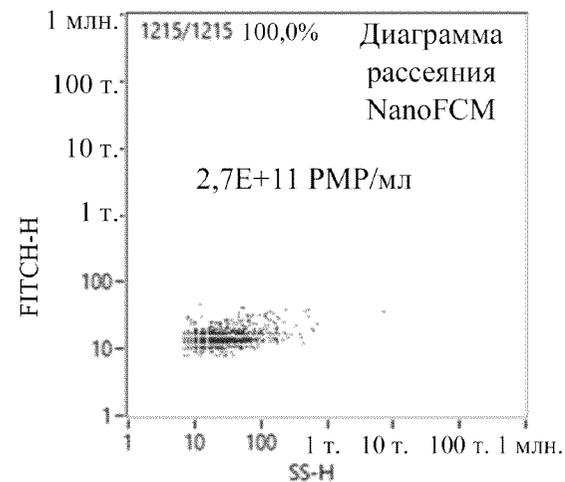
Размер РМР грейпфрута (нм)



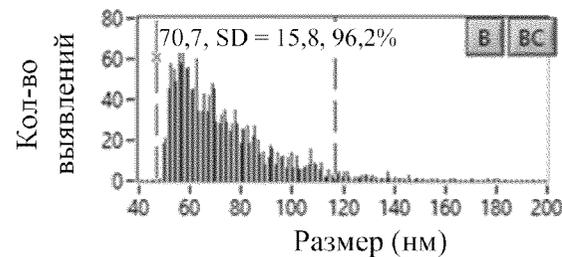
Средний размер: 71,9 нм +/- 14,5 нм

Фиг. 5G

Концентрация РМР лимона в объединенных фракциях после SEC после стерилизации с использованием фильтра с диаметром ячеек 0,22 мкм

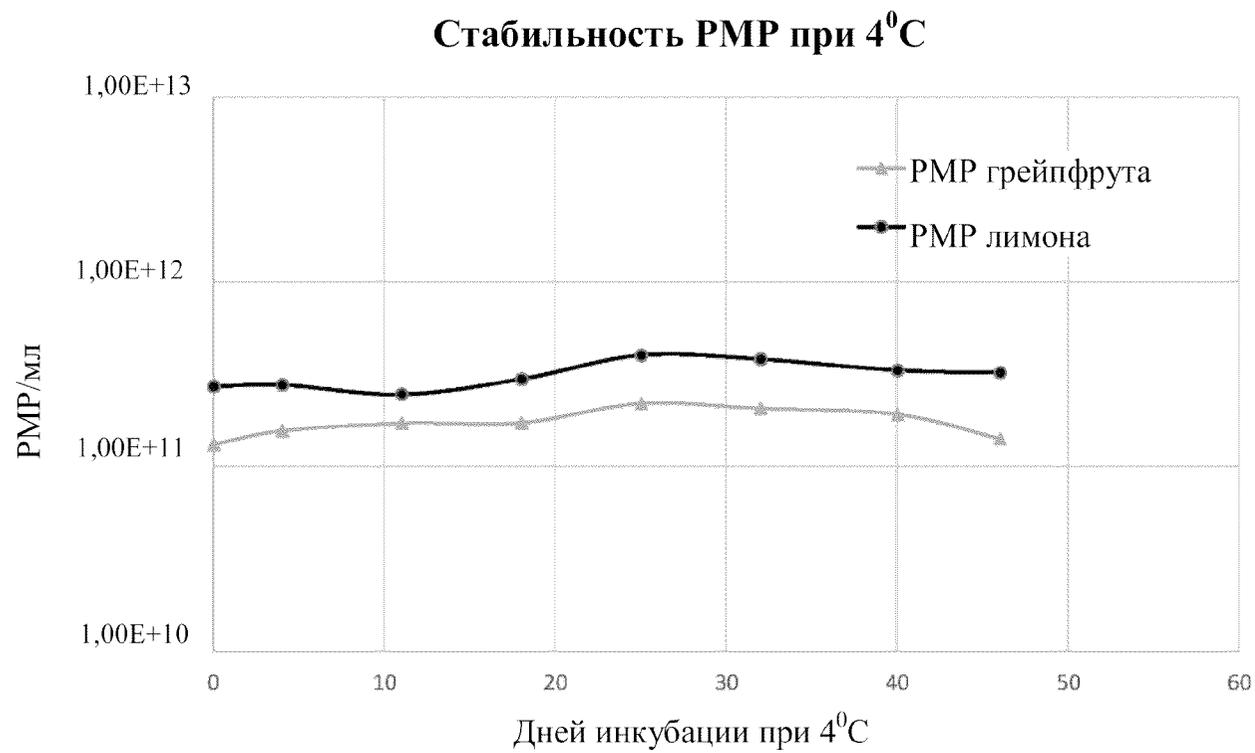


Размер РМР лимона (нм)



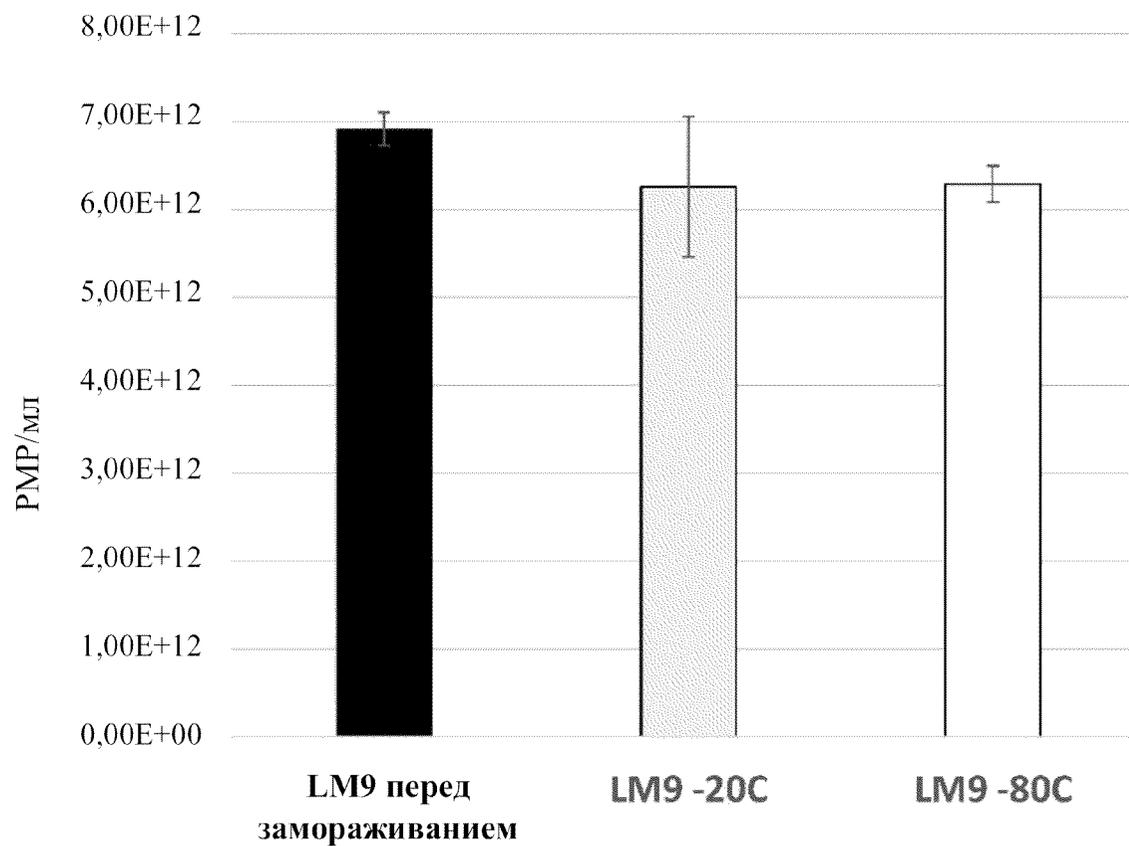
Средний размер: 70,7 нм +/- 15,8 нм

Фиг. 5Н



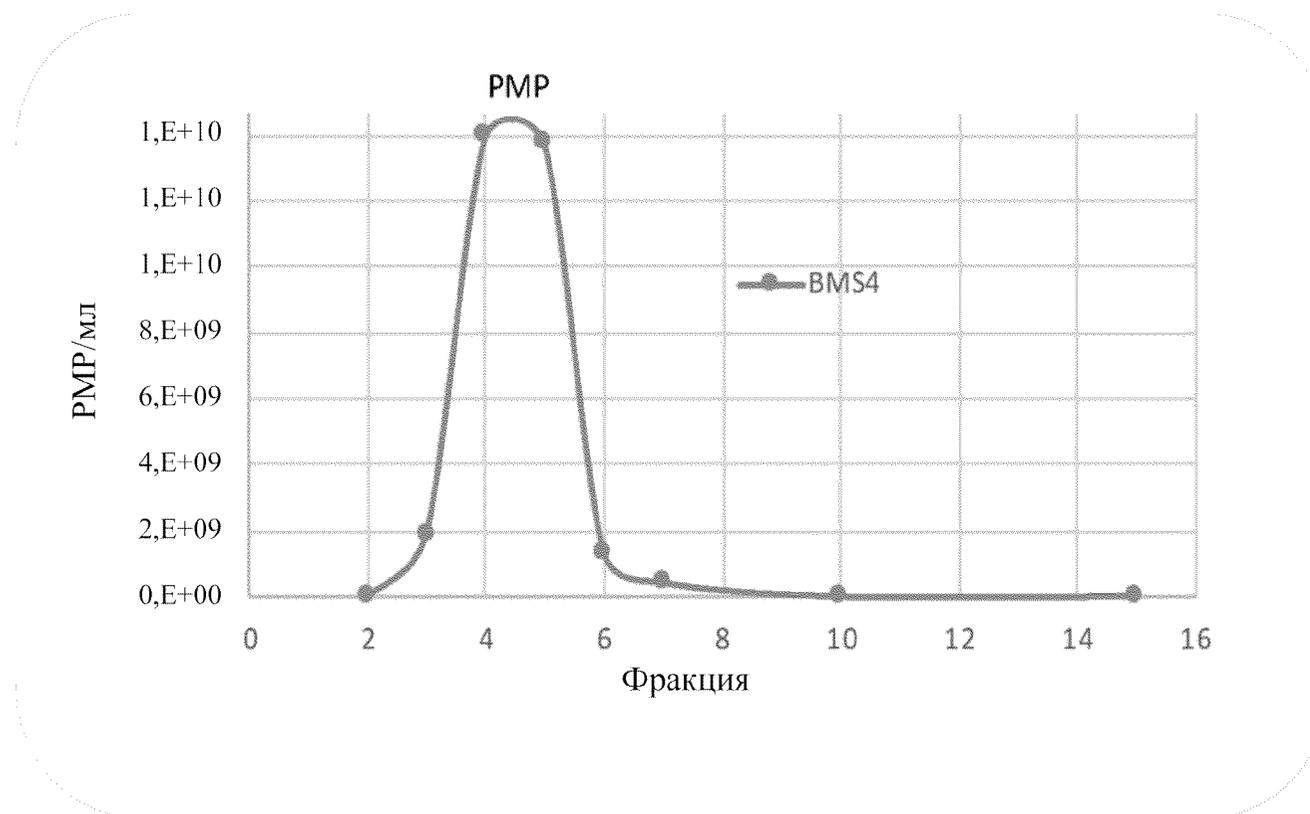
Фиг. 5I

**Стабильность РМР при замораживании
оттаивании (1 цикл)**



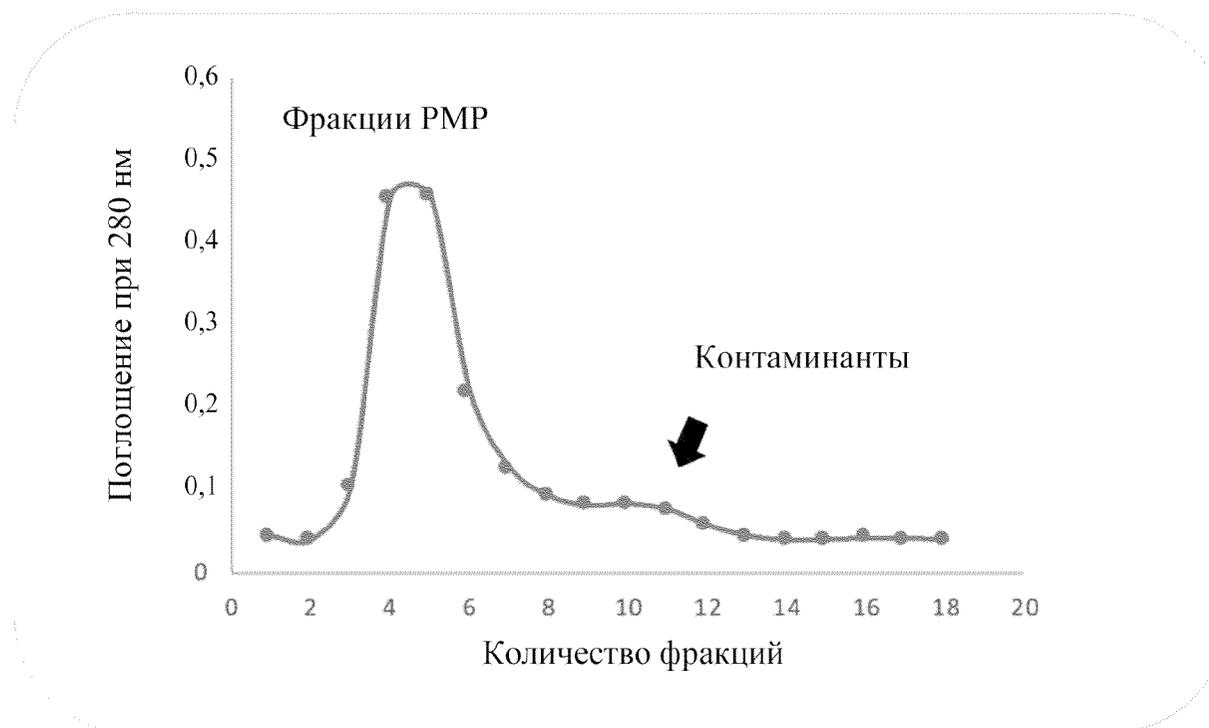
Фиг. 6А

**Концентрация частиц в элюированной
фракции BMS после SEC (частиц/мл)**



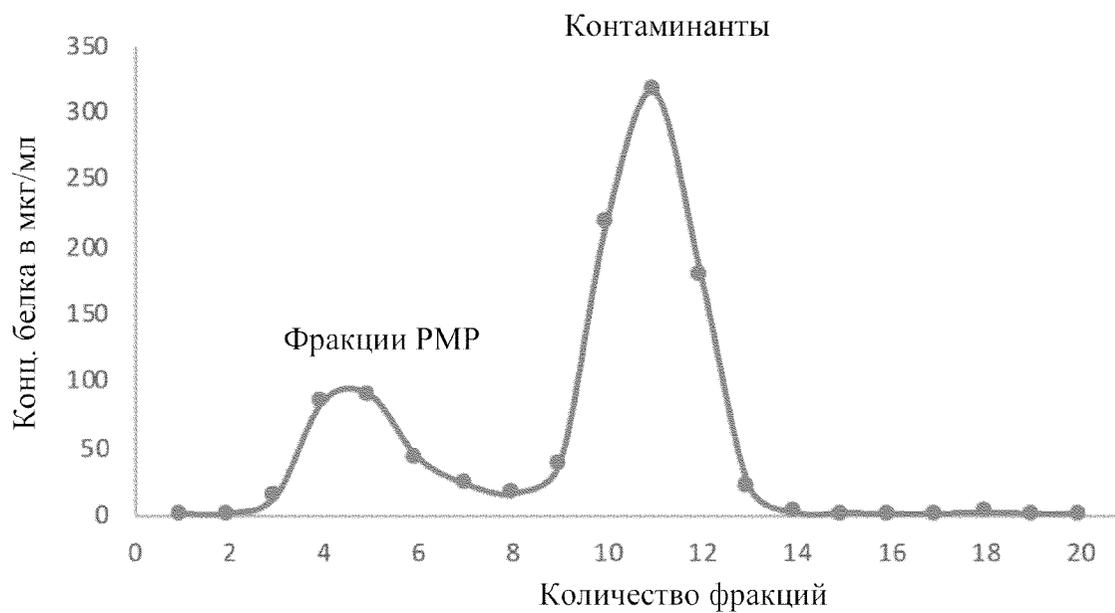
Фиг. 6В

**Поглощение при 280 нм (A.U.) в
элюированных с помощью SEC фракций BMS**



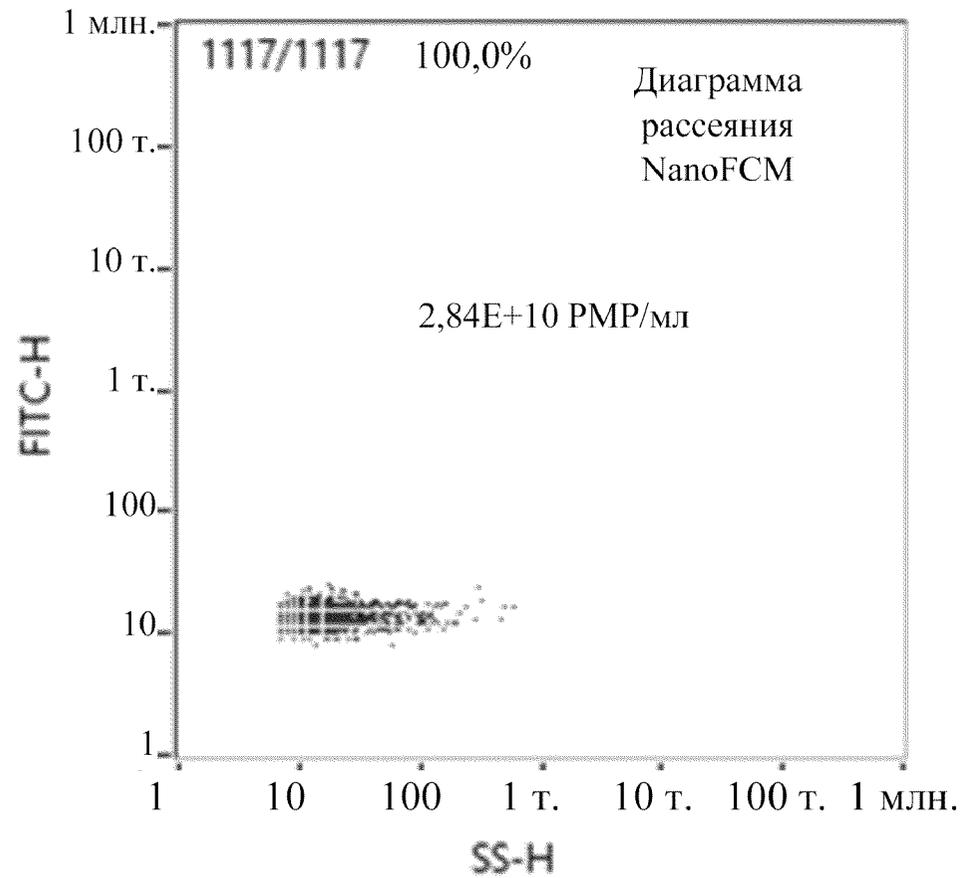
Фиг. 6С

Концентрация белка (мкг/мл) в элюированных с помощью SEC фракциях BMS



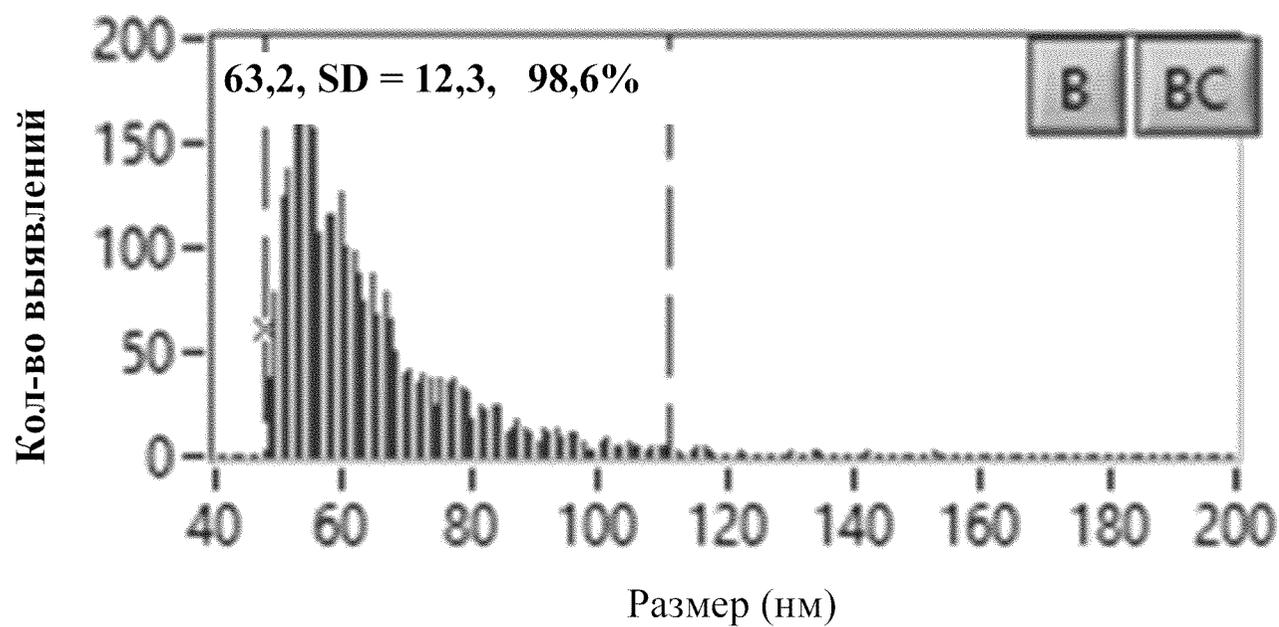
Фиг. 6D

Концентрация PMP BMS в объединенных
фракциях после SEC



Фиг. 6Е

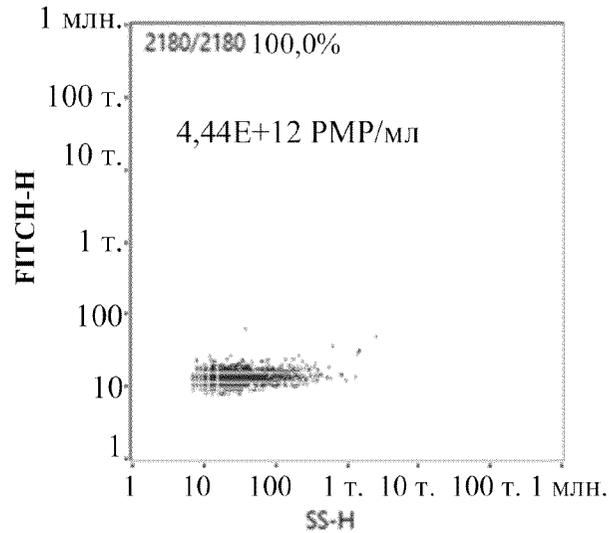
Размер PMP BMS



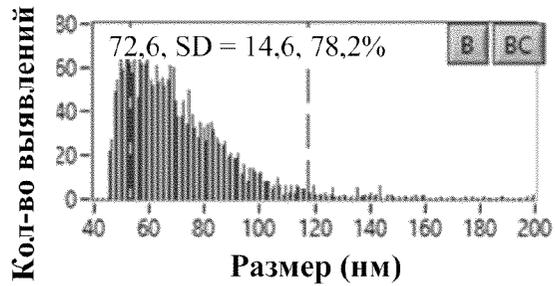
Медианный размер: 63,2 нм +/- 12,3 нм SD

Фиг. 7А

**Концентрация DyLight800-
PMP грейпфрута**



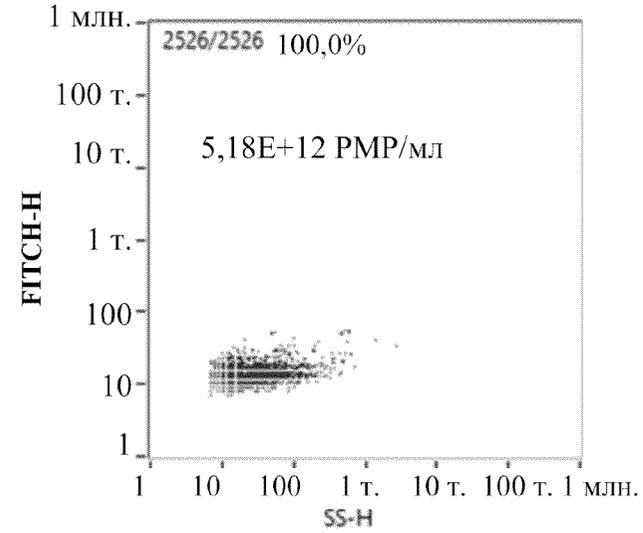
**Размер DyLight800-PMP
грейпфрута (нм)**



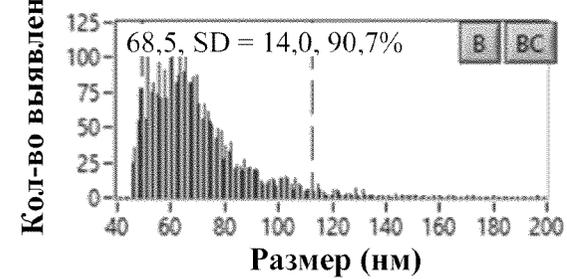
Медианный размер: 72,6 нм +/- 14,6 нм

Фиг. 7В

**Концентрация DyLight800-
PMP лимона**



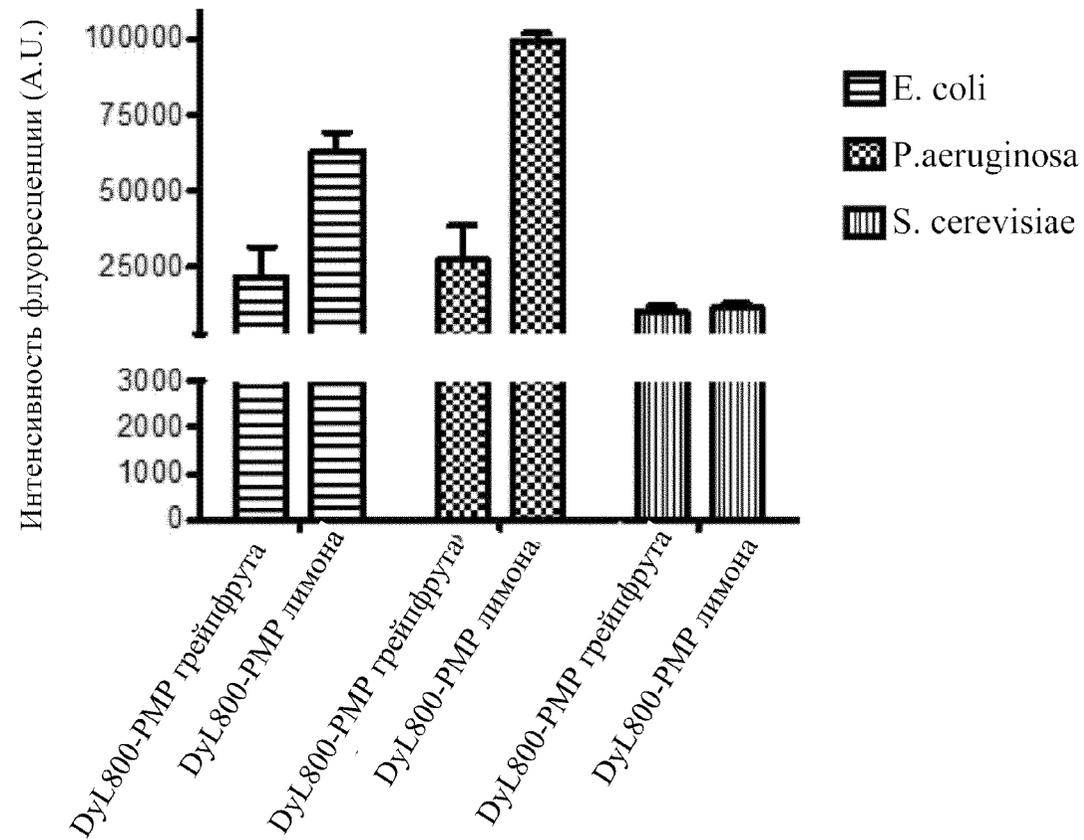
**Размер DyLight800-PMP
лимона (нм)**



Медианный размер: 68,5 нм +/- 14 нм

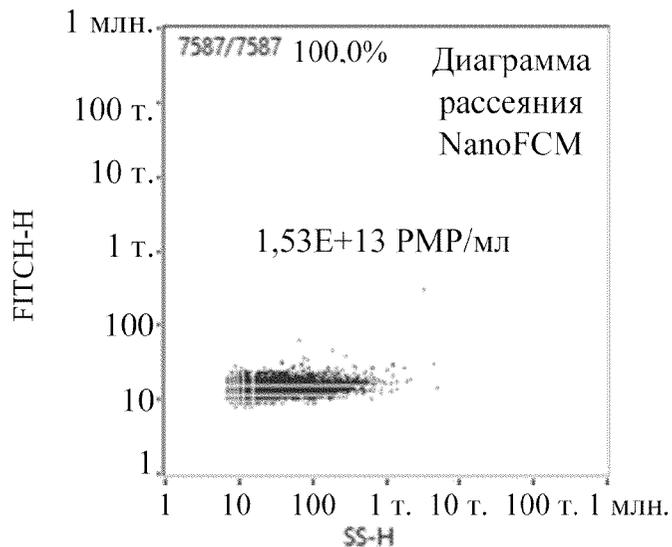
Фиг. 7С

Захват DyL800nm-меченых РМР, полученных из грейпфрута и лимона, бактериями и дрожжами (2 часа после обработки), нормализованный по обработанным только красителем контролям микроорганизмов

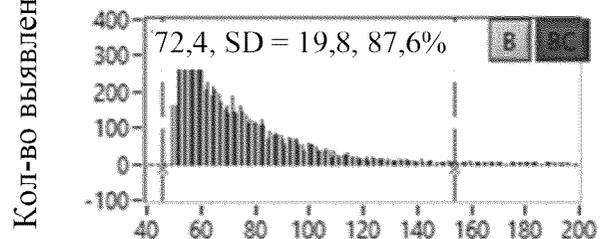


Фиг. 8А

Концентрация РМР из лимона



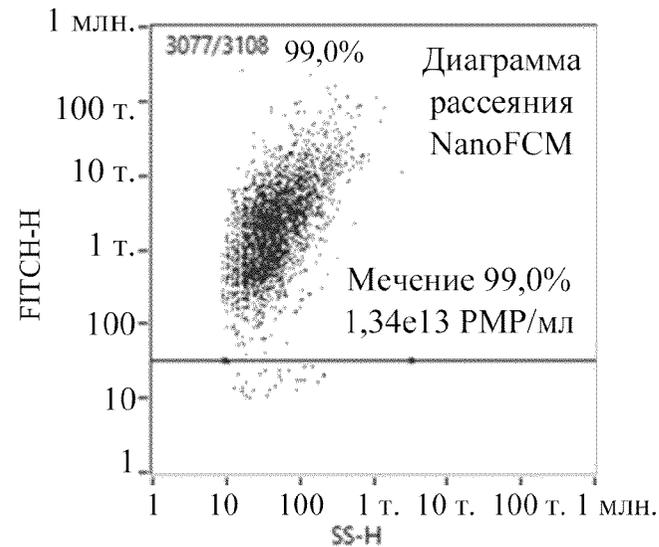
Размер РМР из лимона



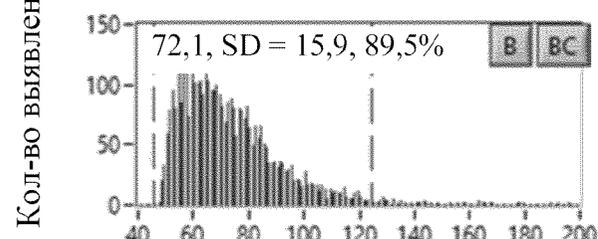
Медианный размер: 72,4 нм +/- 19,8 нм SD

Фиг. 8В

Концентрация AF488-РМР из лимона



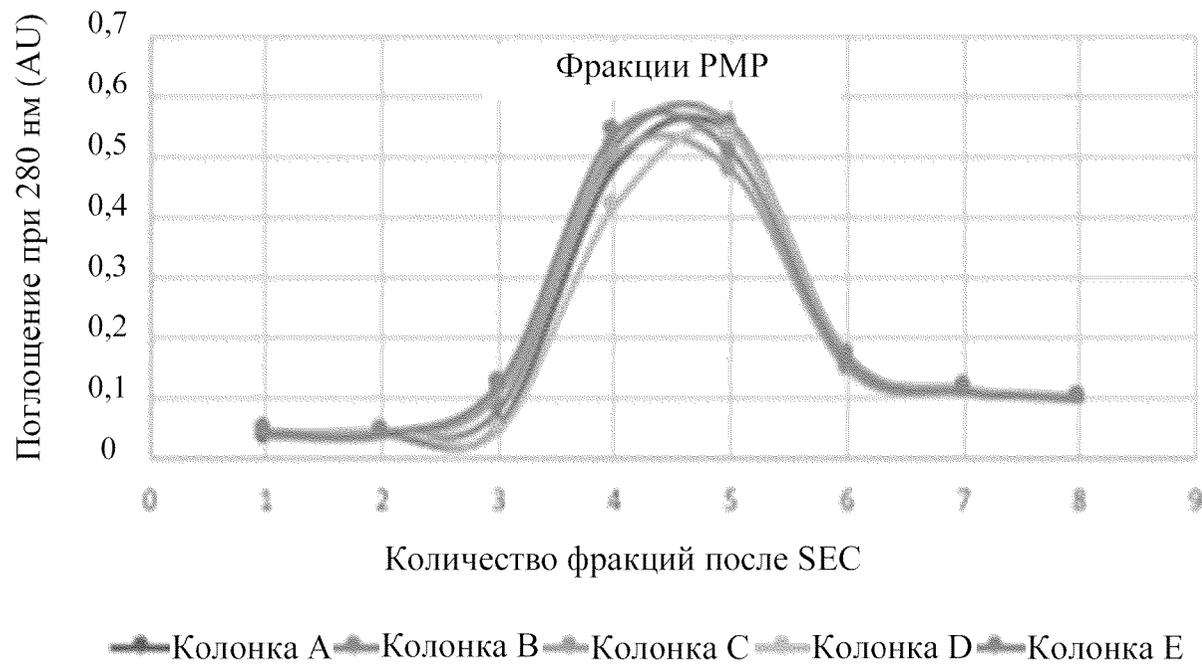
Размер AF488-РМР из лимона



Медианный размер: 72,1 нм +/- 15,9 нм SD

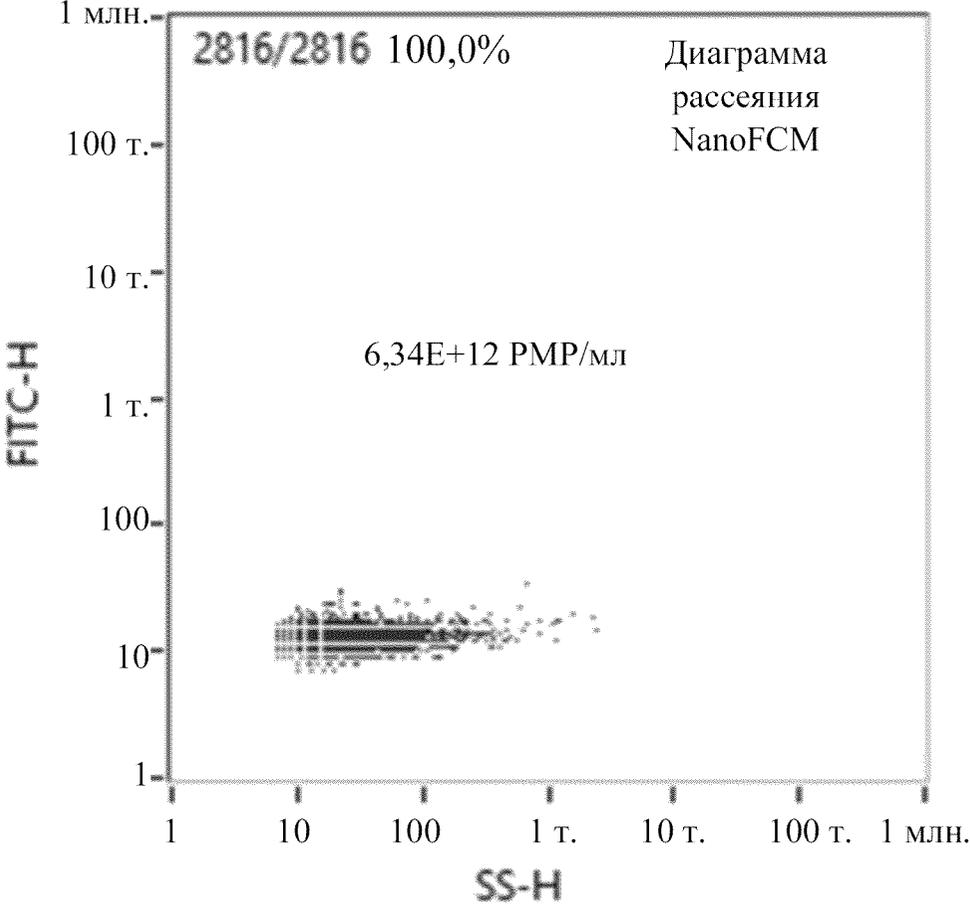
Фиг. 9А

Поглощение при 280 нм (A.U.) элюированными с помощью SEC фракциями грейпфрута



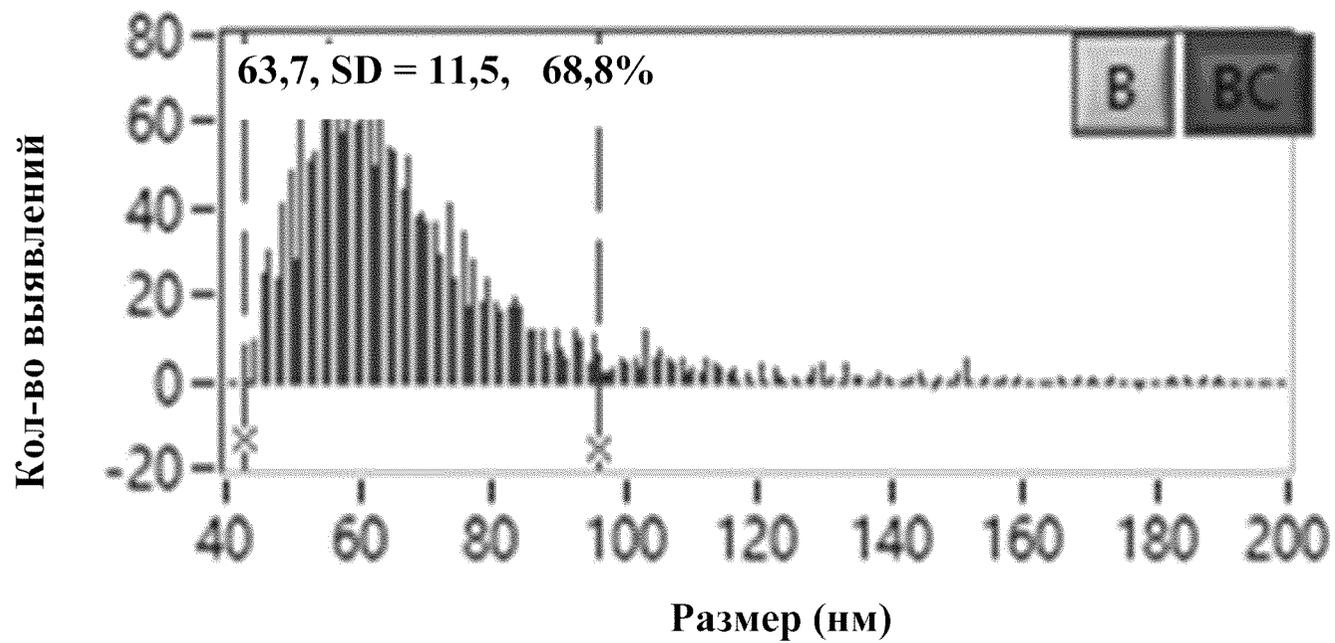
Фиг. 9В

Концентрация РМР грейпфрута из объединенных фракций после SEC



Фиг. 9С

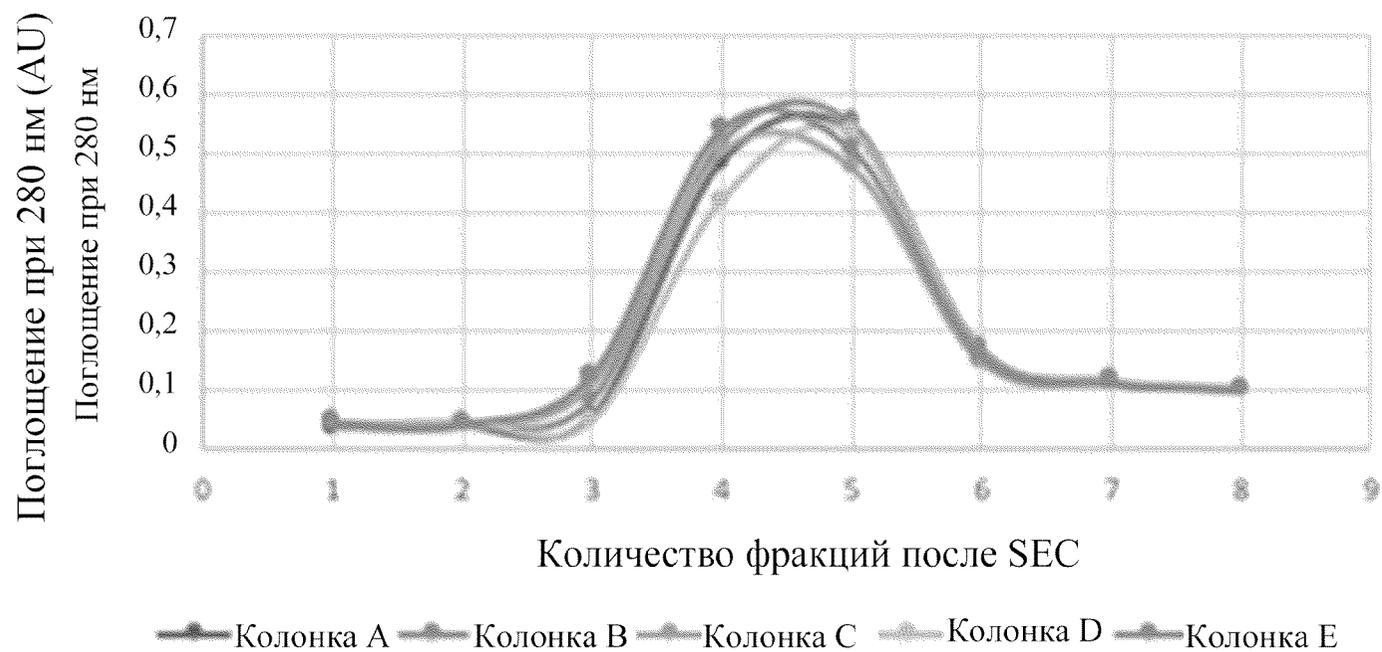
Размер РМР грейпфрута



Медианный размер: 63,7 нм +/- 11,5 нм SD

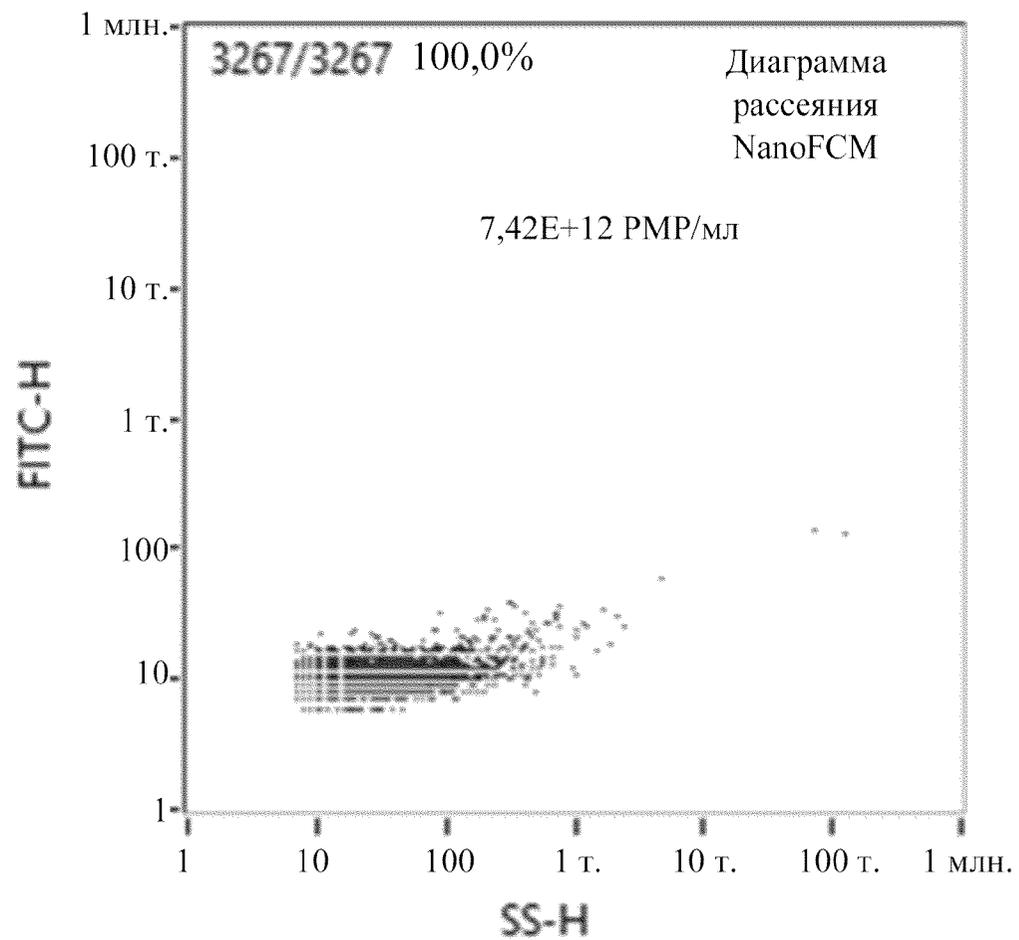
Фиг. 9D

Поглощение при 280 нм (A.U.) элюированными с помощью SEC фракциями лимона



Фиг. 9Е

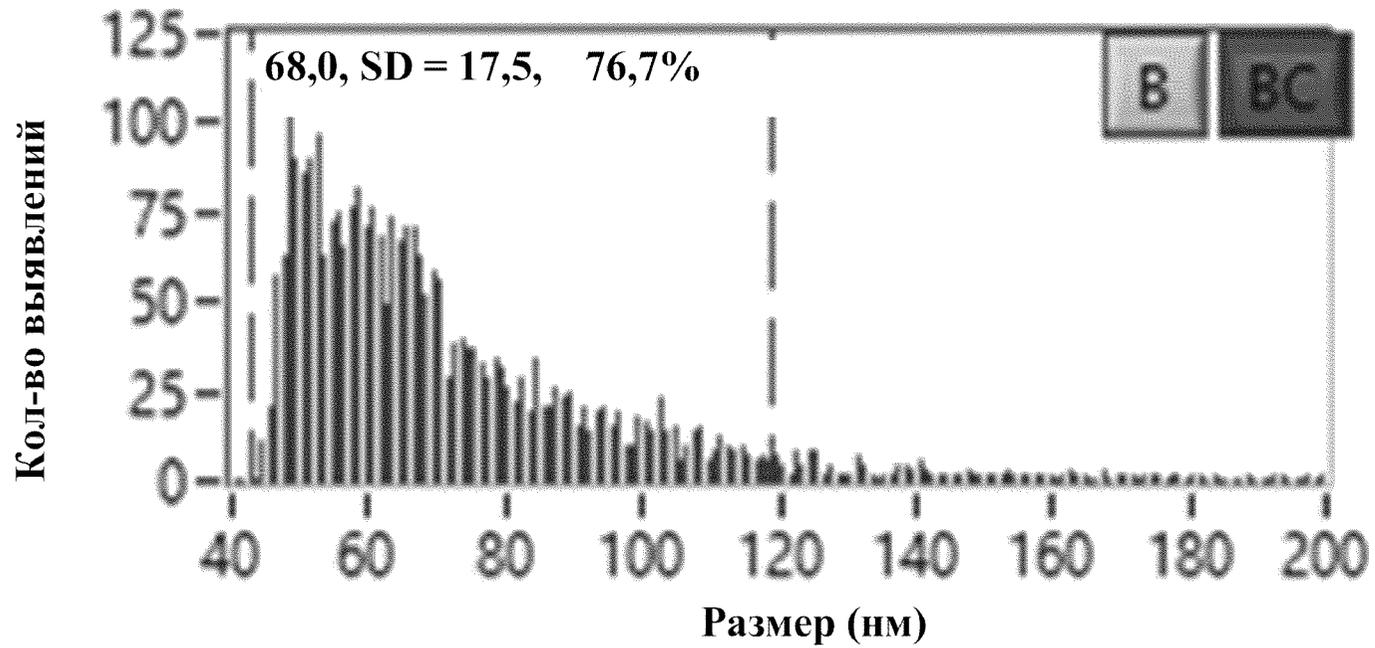
Концентрация РМР из лимона из объединенных фракций
после SEC



32/44

Фиг. 9F

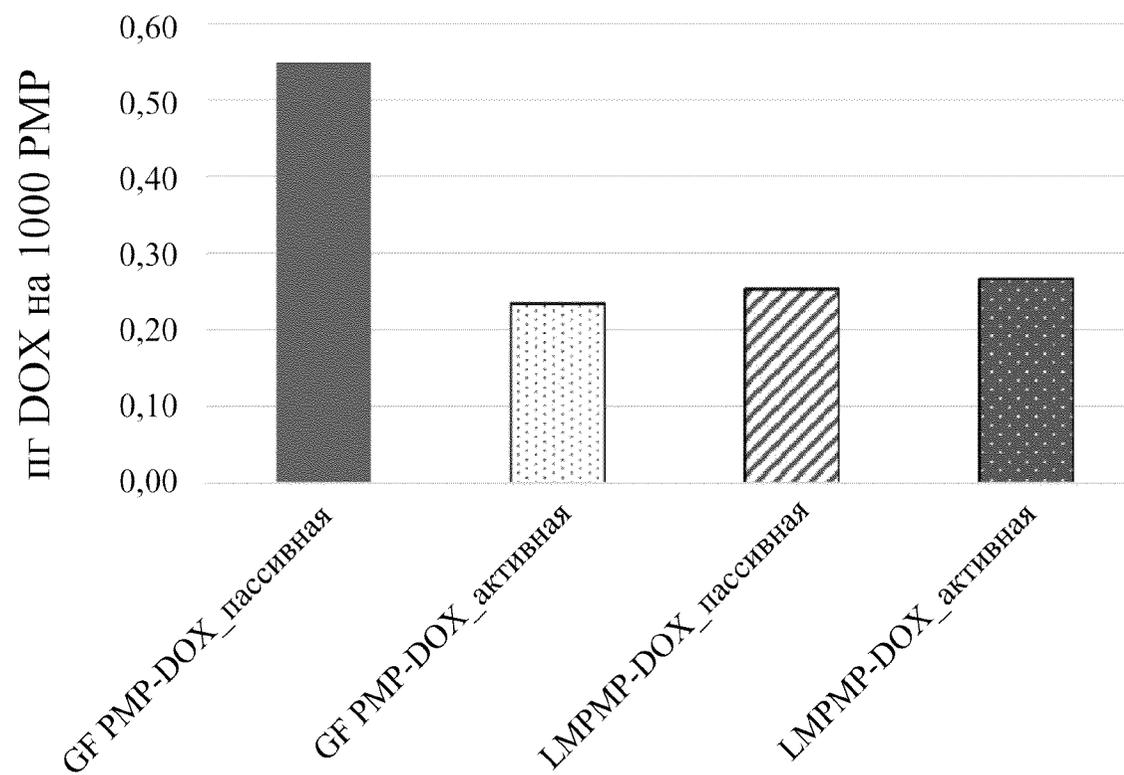
Размер РМР из лимона



Медианный размер: 68 нм +/- 71,5 нм SD

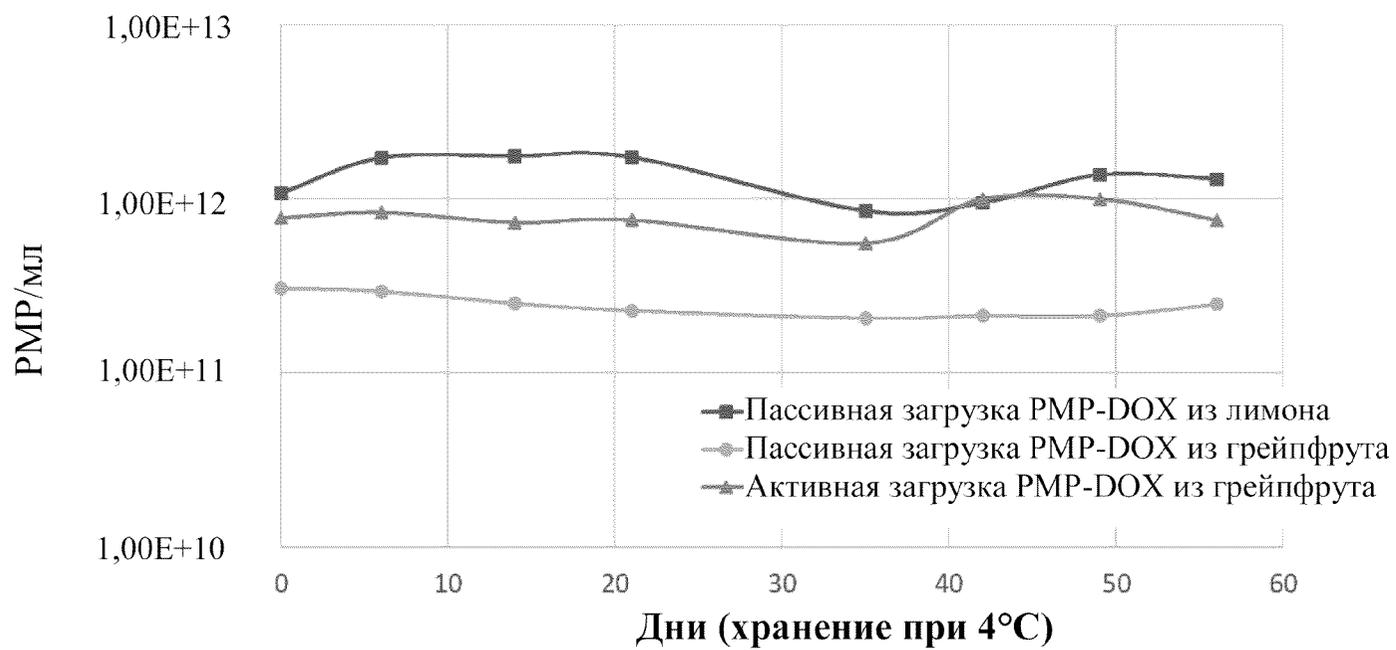
Фиг. 9G

**Нагрузочная способность DOX в PMP из лимона
и грейпфрута**

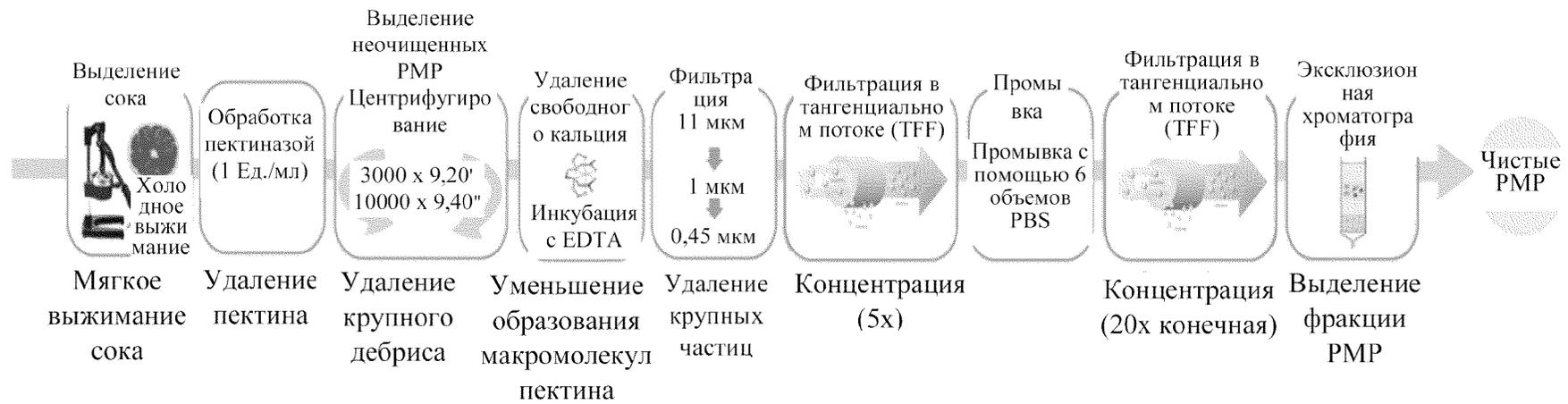


Фиг. 9Н

Стабильность нагруженных DOX PMP

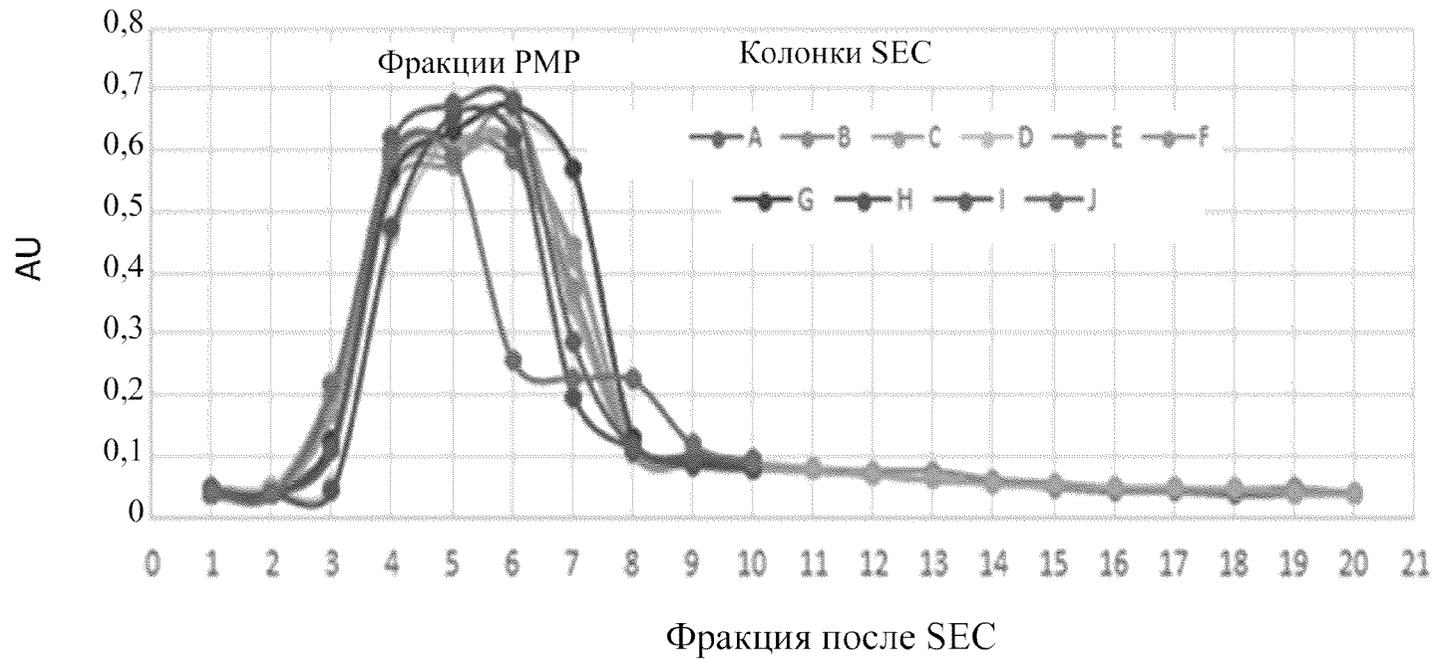


Фиг. 10А



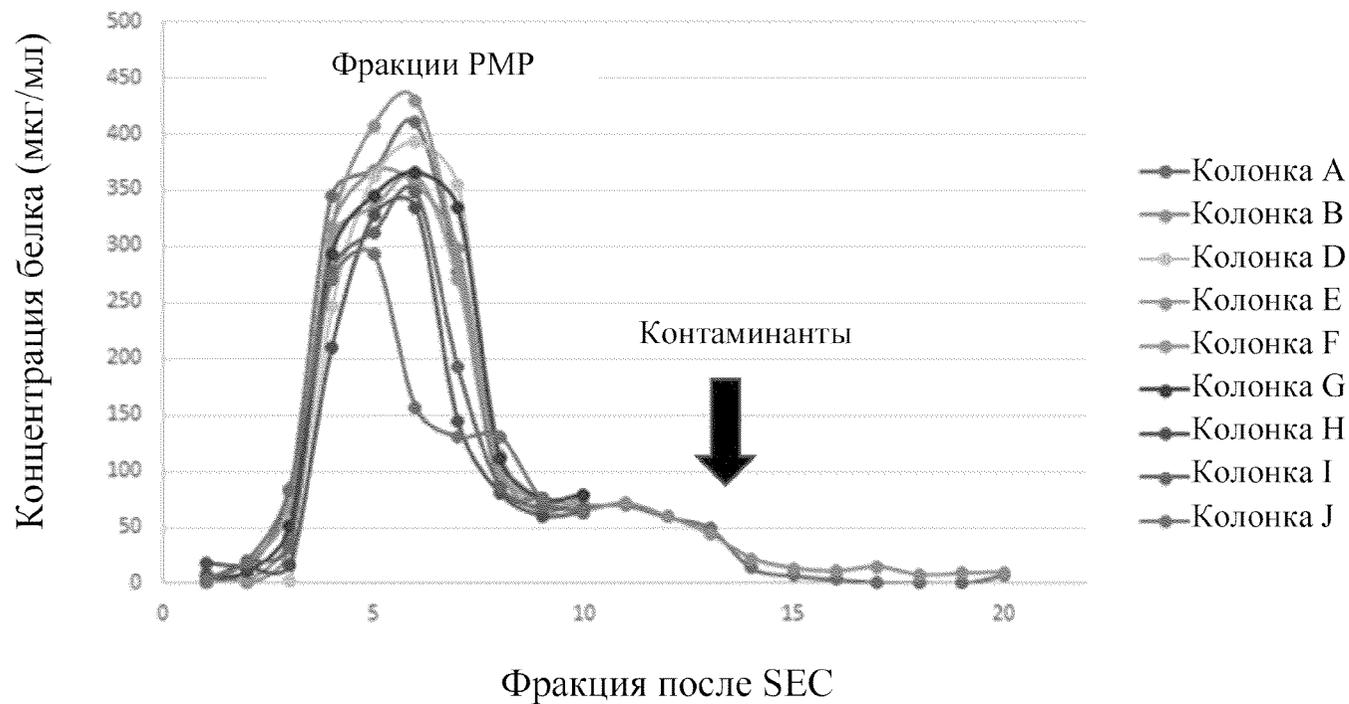
Фиг. 10В

Поглощение при 280 нм (А.У.) элюированных с помощью SEC фракций 9 различных колонок для SEC (А-Ж)



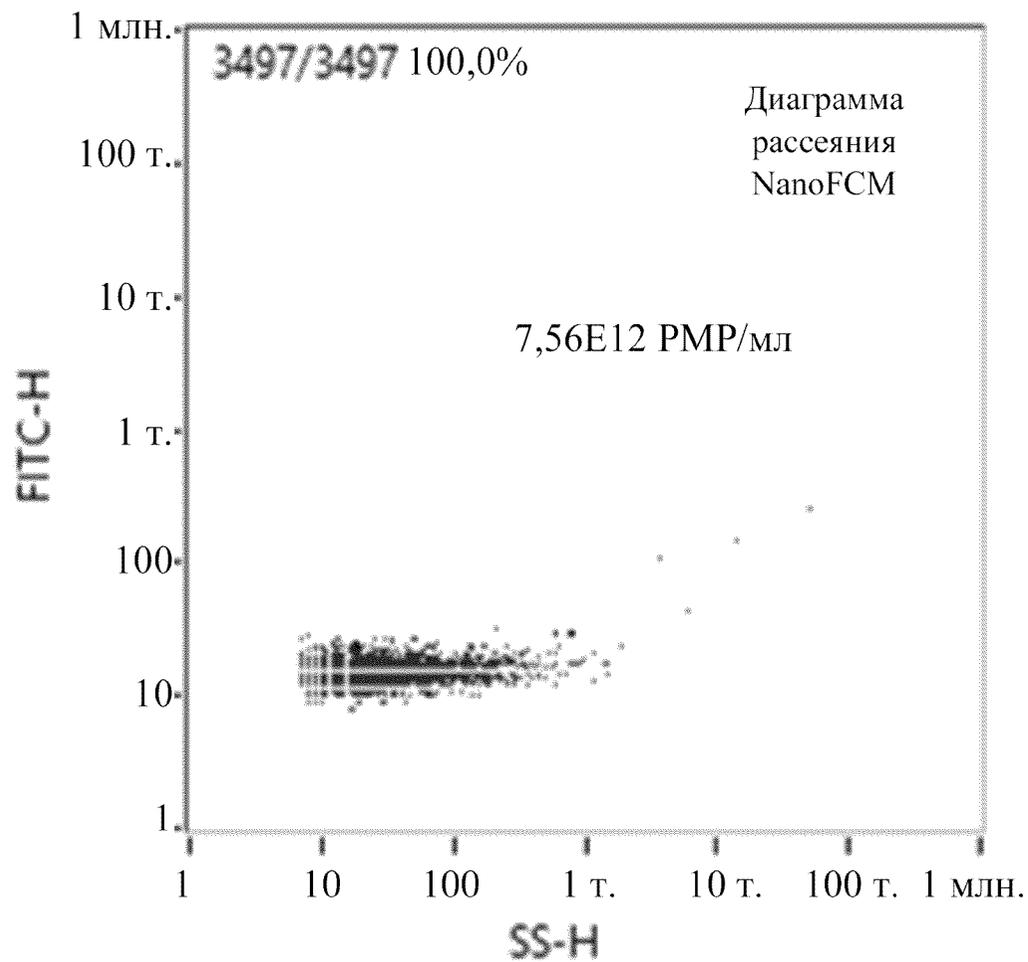
Фиг. 10С

Концентрация белка (мкг/мл) элюированных с помощью SEC фракций
9 различных колонок для SEC (А-І)



Фиг. 10D

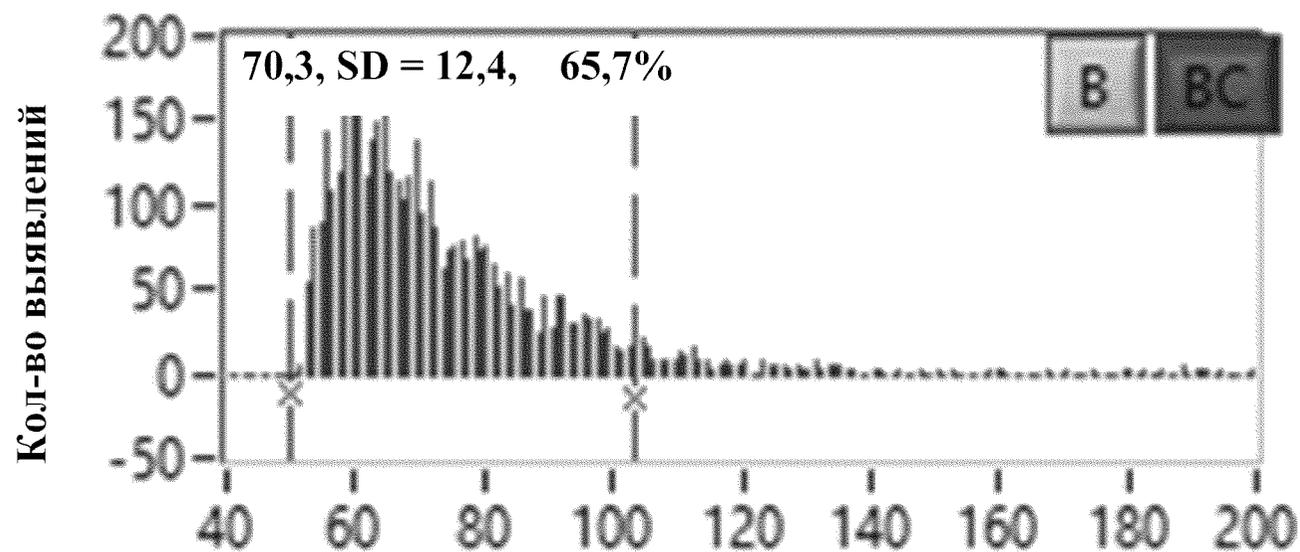
Концентрация РМР в объединенных
фракциях после SEC



39/44

Фиг. 10Е

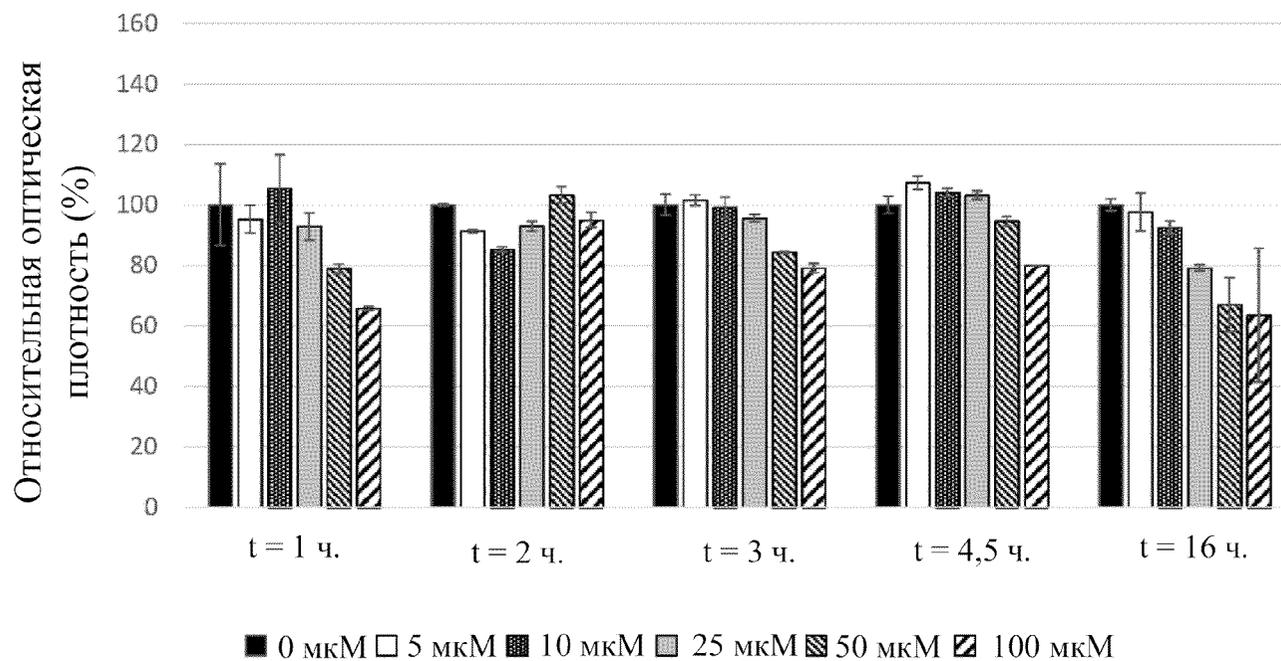
Размер РМР в объединенных фракциях после SEC



Медианный размер: 70,3 нм +/- 12,4 нм SD

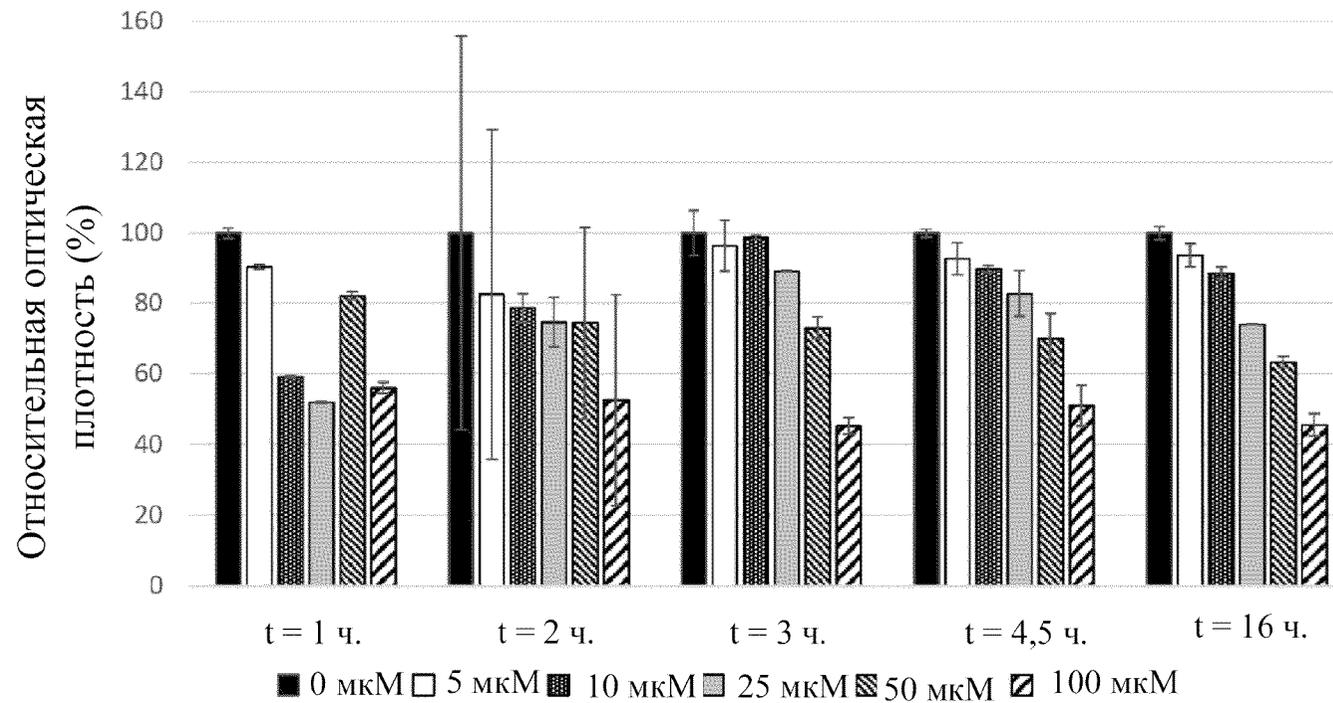
Фиг. 10F

Обработка *P. aeruginosa* с помощью РМР
грейпфрута, нагруженных доксорубицином (DOX)

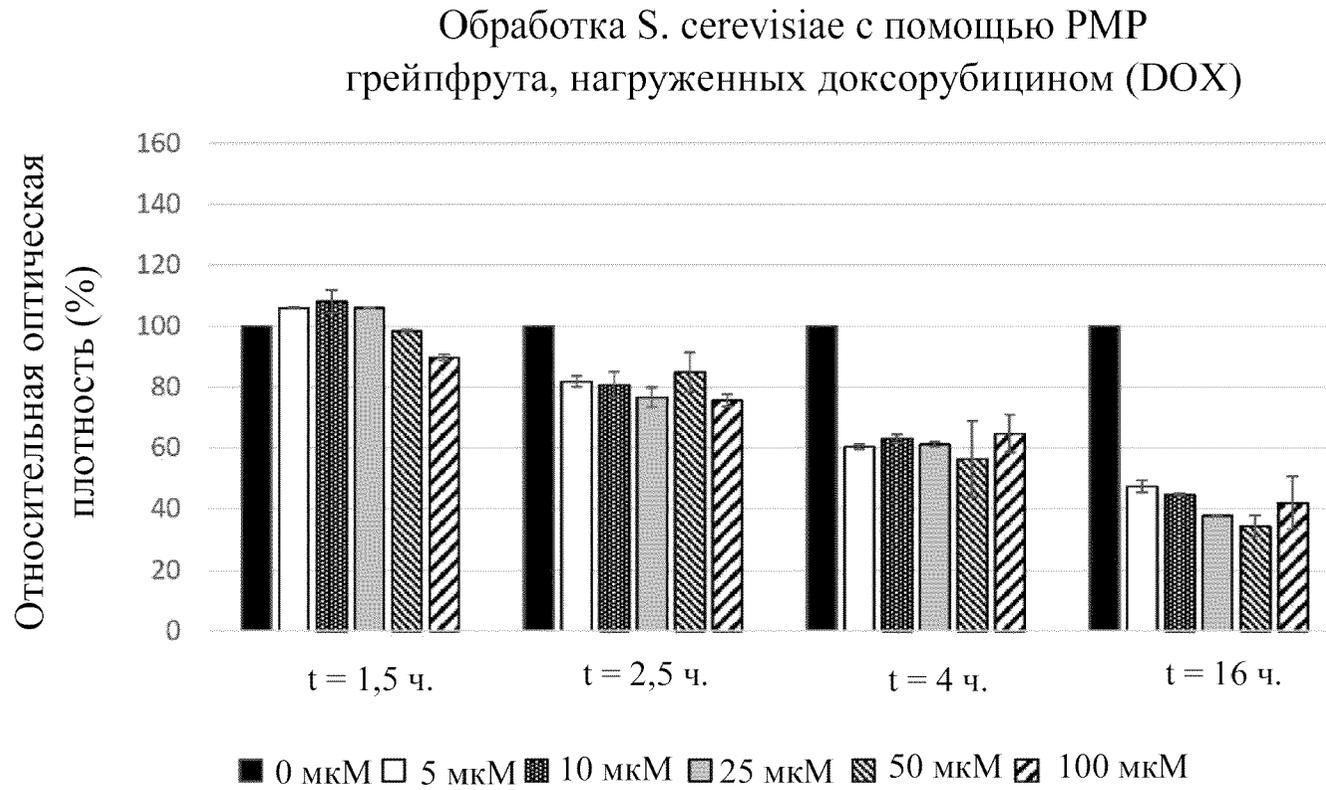


Фиг. 10G

Обработка *E. coli* с помощью РМР грейпфрута,
нагруженных доксорубицином (DOX)



Фиг. 10Н



Фиг. 11

