

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190368 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.10

(51) Int. Cl. A61K 9/127 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.24

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПАКЕТЫ-МЕССЕНДЖЕРЫ РАСТЕНИЙ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/722,576

(72) Изобретатель:

(32) 2018.08.24

Фан Ройен Мария Хелена Христине,
Там Хок Хеи, Авенданьо Амадо
Майер Стив, Мартин Барри Эндрю,
Мартинес Игнасио, Ковальски Петр
Станислав, Нуколова Наталия
Владимировна, Кейси Джон Патрик,
мл. (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/048046

(87) WO 2020/041783 2020.02.27

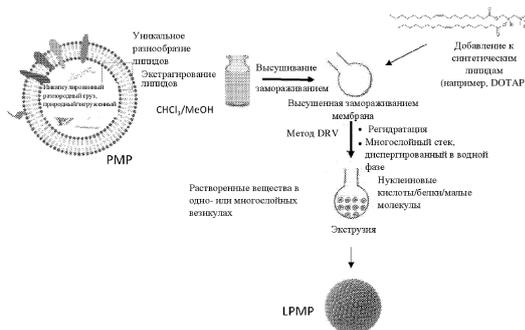
(71) Заявитель:

ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ
ИННОВЕЙШНЗ VI, ЭлЭлСи (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении раскрыты композиции, содержащие совокупность пакетов-мессенджеров растений (например, содержащих растительную внеклеточную везикулу (EV) или ее сегмент, часть или экстракт), которые модифицированы таким образом, что они характеризуются повышенным поглощением клетками (например, поглощением клетками животных, растительными клетками, поглощением бактериальными клетками или поглощением клетками гриба), например, для применения в различных сельскохозяйственных или терапевтических способах.



A1

202190368

202190368

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567309EA/011

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПАКЕТЫ-МЕССЕНДЖЕРЫ РАСТЕНИЙ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 23 августа 2019 года, называется 51296-005WO2_Sequence_Listing_08.23.19_ST25 и имеет размер 10171 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Доставка сельскохозяйственных или терапевтических средств может быть ограничена в той степени, в которой средство способно проникать через клеточные барьеры и тем самым эффективно воздействовать на организм. Например, барьер, образованный клеточной стенкой растения, бактериальной клеточной стенкой или клеточной стенкой гриба, или клеточной мембраной и/или внеклеточным матриксом клетки животного, создает проблему для клеточного поглощения средств, применимых в сельском хозяйстве или терапии. Следовательно, в данной области техники существует потребность в способах и композициях, способствующих клеточному поглощению средств.

Краткое описание изобретения

В данном документе раскрыты модифицированные пакеты-мессенджеры растений (РМР), которые характеризуются повышенным поглощением клетками (например, растительными клетками, клетками грибов или бактериальными клетками). Модифицированные РМР, представленные в данном документе, можно использовать в различных сельскохозяйственных или терапевтических композициях или способах.

В первом аспекте в данном документе представлен способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный катионный липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный катионный липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV).

В некоторых вариантах осуществления повышенное поглощение клетками представляет собой поглощение клетками, которое на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% превышает такое поглощение у немодифицированного РМР.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные РМР содержат

гетерологичное функциональное средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство 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 клетка представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека), растительную клетку, бактериальную клетку или клетку гриба.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками по сравнению с немодифицированным РМР. В некоторых случаях клетка представляет собой растительную клетку. В некоторых случаях клетка представляет собой клетку гриба. В некоторых случаях клетка представляет собой бактериальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления повышенное поглощение клетками представляет собой поглощение клетками, которое на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% превышает такое поглощение у немодифицированного РМР. В некоторых вариантах осуществления повышенное поглощение клетками представляет собой поглощение клетками, которое в по меньшей мере 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз или 1000 раз превышает такое поглощение у немодифицированного РМР.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные РМР включают средство, способствующее проникновению в клетку.

В некоторых вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой фермент или его функциональный домен (например, домен расщепления растительной клеточной стенки, домен расщепления бактериальной клеточной стенки или домен расщепления клеточной стенки гриба).

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой бактериальный фермент, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых вариантах осуществления фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериального фермента, способного расщеплять растительные клеточные стенки, или ее частью. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой фермент гриба, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых вариантах осуществления фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента гриба, способного расщеплять растительные клеточные стенки, или ее частью. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой растительный фермент, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых вариантах осуществления фермент, расщепляющий клеточные стенки, характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или

осуществления фермент представляет собой растительный фермент, способный расщеплять клеточные стенки гриба. В некоторых вариантах осуществления фермент, расщепляющий клеточные стенки, характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью растительного фермента, способного расщеплять клеточные стенки гриба, или ее частью. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой фермент простейших, способный расщеплять клеточные стенки гриба. В некоторых вариантах осуществления фермент, расщепляющий клеточные стенки, характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента простейших, способного расщеплять клеточные стенки гриба, или ее частью.

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой целлюлазу. В некоторых вариантах осуществления целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериальной целлюлазы или ее частью. В некоторых вариантах осуществления целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы гриба или ее частью. В некоторых вариантах осуществления целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы простейшего или ее частью.

В некоторых вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, является детергентом. В некоторых вариантах осуществления детергент представляет собой сапонин.

В некоторых вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, включает катионный липид. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC). В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой 1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC).

В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение по меньшей мере 24 часов (например, по меньшей мере 24 часа, 30 часов или 40 часов), по меньшей мере 48 часов (например, по меньшей мере 48 часов (= 2 дням), 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней), по меньшей мере семи дней (например, по меньшей мере семи дней (= 1 неделе), по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель) или по меньшей мере 30 дней (например, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 60 дней или по меньшей мере 90 дней). В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной при температуре, составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 37°C, 42°C или выше 42°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

по меньшей мере -80°C (например, по меньшей мере -80°C , -70°C , -60°C , -50°C , -40°C или -30°C). В некоторых вариантах осуществления РМР стабильны в жидком азоте (при приблизительно $-195,8^{\circ}\text{C}$). В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или стабильна в течение по меньшей мере одной недели при 4°C . В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной при воздействии УФ-излучения. В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение периода, определенного в данном документе, при температуре естественной среды обитания растения.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций РМР могут включать совокупность белков (т. е. белков РМР), и концентрация РМР может измеряться по концентрации в них белков РМР. В некоторых вариантах осуществления совокупность РМР в композиции имеет концентрацию, составляющую по меньшей мере $0,025$ мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере $0,025$, $0,05$, $0,1$ или $0,5$ мкг белка РМР/мл), по меньшей мере 1 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 или 9 мкг белка РМР/мл), по меньшей мере 10 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 35 , 40 или 45 мкг белка РМР/мл), по меньшей мере 50 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 50 , 55 , 60 , 65 , 70 , 75 , 80 , 85 , 90 или 95 мкг белка РМР/мл), по меньшей мере 100 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 100 , 125 , 150 , 175 , 200 или 225 мкг белка РМР/мл), по меньшей мере 250 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 250 , 300 , 350 , 400 , 450 или 500 мкг белка РМР/мл) или по меньшей мере 500 мкг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 500 , 600 , 700 , 800 или 900 мкг белка РМР/мл). В некоторых вариантах осуществления совокупность РМР в композиции имеет концентрацию, составляющую по меньшей мере 1 мг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 или 9 мг белка РМР/мл) или по меньшей мере 10 мг белка РМР/мл (например, по меньшей мере 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90 или 100 мг белка РМР/мл).

В некоторых вариантах осуществления композиций в данном документе РМР включают очищенную растительную внеклеточную везикулу (EV) или ее сегмент или экстракт. В некоторых вариантах осуществления растительная EV представляет собой модифицированную растительную внеклеточную везикулу (EV). В определенных вариантах осуществления растительная EV представляет собой растительную экзосому или растительную микровезикулу. В некоторых вариантах осуществления РМР включают маркер растительной EV, как, например, маркеры, указанные в приложении.

В некоторых вариантах осуществления композиций в данном документе совокупность РМР может быть чистой. Например, композиция может по сути не содержать (например, содержать менее 25% , 20% , 15% , 10% , 5% , 2%) органелл, таких как растительные хлоропласты, митохондрии или ядра).

В некоторых вариантах осуществления модифицированные РМР содержат гетерологичное функциональное средство. В некоторых вариантах осуществления

модифицированные РМР содержат два или более различных гетерологичных функциональных средств. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство инкапсулировано в каждый РМР из совокупности РМР. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой гетерологичное сельскохозяйственное средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное сельскохозяйственное средство представляет собой пестицидное средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой удобряющее средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой пестицидное средство. В некоторых вариантах осуществления пестицидное средство представляет собой противогрибковое средство, антибактериальное средство, инсектицидное средство, моллюскоцидное средство, нематоцидное средство или гербицидное средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой репеллентное средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой средство, модифицирующее растения.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой гетерологичное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное терапевтическое средство включает противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллентное средство.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичное функциональное средство представляет собой гетерологичный полипептид, гетерологичную нуклеиновую кислоту или гетерологичную малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления гетерологичной нуклеиновой кислотой является ДНК, РНК, РНА или гибридная молекула ДНК-РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой информационную РНК (mRNA), направляющую РНК (gRNA) или ингибирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК представляет собой RNAi, shRNA или miRNA. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК подавляет экспрессию генов у растения. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК подавляет экспрессию генов у симбионта растения.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой mRNA, модифицированную mRNA или молекулу ДНК, которая повышает в растении экспрессию фермента, порообразующего белка, сигнального лиганда, пептида, проникающего в клетку, фактора транскрипции, рецептора, антитела, нанотела, белка для

редактирования генов, рибопротеина, белкового аптамера или шаперона.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолино, LNA, piRNA, рибозим, DNzyme, аптамер, circRNA, gRNA или молекулу ДНК, которая понижает в растении экспрессию фермента, фактора транскрипции, секреторного белка, структурного фактора, рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или транспортера.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой фермент, порообразующий белок, сигнальный лиганд, пептид, проникающий в клетку, фактор транскрипции, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов, рибопротеин, белковый аптамер или шаперон.

В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для доставки по отношению к растению. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для доставки по отношению к животному (например, человеку). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой сельскохозяйственное или садовое растение. В некоторых вариантах осуществления сельскохозяйственное растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы.

В некоторых вариантах осуществления РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения (например, сельскохозяйственного или садового растения).

В некоторых вариантах осуществления сельскохозяйственное растение является сорняком.

В некоторых вариантах осуществления РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для снижения приспособленности растения (например, сорняка).

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных, где РМР получают посредством способа, который включает 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 характеризуется сниженным 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 РМР из чистых РМР, где совокупность чистых РМР

характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; (d) загрузки чистых РМР средством, способствующим проникновению в клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных по сравнению с немодифицированными РМР; и (e) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к животному.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получают посредством способа, который включает стадии: (a) получения растения или его части; (b) высвобождения совокупности внеклеточных везикул (EV) из растения или его части и сбора EV в исходном образце; (c) отделения совокупности EV в фракцию неочищенных EV, где фракция неочищенных EV характеризуется сниженным уровнем растительных клеток или клеточного дебриса по сравнению с уровнем в исходном образце; (d) очистки фракции неочищенных EV с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется сниженным уровнем растительных органелл, компонентов клеточной стенки или растительных молекулярных агрегатов (например, белковых агрегатов, агрегатов белок-нуклеиновая кислота, липопротеиновых агрегатов или липидно-белковых структур) по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; и (e) загрузки чистых РМР гетерологичным функциональным средством, которое увеличивает поглощение растительными клетками, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками по сравнению с немодифицированными РМР.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением бактериальными клетками, где РМР получают посредством способа, который включает стадии: (a) получения растения или его части; (b) высвобождения совокупности внеклеточных везикул (EV) из растения или его части и сбора EV в исходном образце; (c) отделения совокупности EV в фракцию неочищенных EV, где фракция неочищенных EV характеризуется сниженным уровнем растительных клеток или клеточного дебриса по сравнению с уровнем в исходном образце; (d) очистки фракции неочищенных EV с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется сниженным уровнем растительных органелл, компонентов клеточной стенки или растительных молекулярных агрегатов (например, белковых агрегатов, агрегатов белок-нуклеиновая кислота, липопротеиновых агрегатов или липидно-белковых структур) по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; и (e) загрузки чистых РМР гетерологичным функциональным средством, которое увеличивает поглощение бактериальными клетками, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением бактериальными клетками по сравнению

с немодифицированными РМР.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками гриба, где РМР получают посредством способа, который включает 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 характеризуется сниженным 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 сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; (d) загрузки чистых РМР средством, способствующим проникновению в растительную клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками по сравнению с немодифицированным РМР; и (е) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к растению.

В другом аспекте в данном документе представлено растение, содержащее любую композицию на основе РМР, описанную в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлена бактерия, содержащая любую композицию на основе РМР, описанную в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлен гриб, содержащий любую композицию на основе РМР, описанную в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлен способ доставки композиции на основе РМР по отношению к растению, включающий приведение в контакт растения с любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности млекопитающего, где способ включает доставку млекопитающему эффективного количества любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности млекопитающего по сравнению с необработанным млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает доставку по отношению к растению эффективного количества любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением. В некоторых вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное удобряющее средство. В некоторых вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное средство, модифицирующее растения. В некоторых

вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное пестицидное средство. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой сельскохозяйственное или садовое растение. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы.

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности растения, при этом способ включает доставку по отношению к растению эффективного количества любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает снижение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением. В некоторых вариантах осуществления РМР содержат гетерологичный гербицид. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой сорняк.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, доставку композиции на основе РМР осуществляют по отношению к листьям, семенам, корням, плодам, побегам или цветкам растения.

В другом аспекте в данном документе представлен способ доставки композиции на основе РМР по отношению к бактерии, включающий приведение в контакт бактерии с любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности бактерии, при этом способ включает доставку по отношению к бактерии эффективного количества любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает снижение приспособленности бактерии по сравнению с необработанной бактерией. В некоторых вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное антибактериальное средство. В некоторых вариантах осуществления бактерия является патогеном растений. В некоторых вариантах осуществления бактерия является патогеном животных (например, человека).

В другом аспекте в данном документе представлен способ доставки композиции на основе РМР по отношению к грибу, включающий приведение в контакт гриба с любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности гриба, при этом способ включает доставку по отношению к грибу эффективного количества любой из композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает снижение приспособленности гриба по сравнению с необработанным грибом. В некоторых вариантах осуществления РМР содержит гетерологичное противогрибковое средство. В некоторых вариантах осуществления гриб является патогеном растений. В некоторых вариантах осуществления гриб является патогеном животных (например, человека). В некоторых вариантах осуществления представленных в данном документе способов композицию на основе РМР доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

В другом аспекте в данном документе предусматривается состав для борьбы в сельском хозяйстве, содержащий любую композицию на основе РМР, описанную в

данном документе, и носитель или вспомогательное вещество, подходящие для применения в сельском хозяйстве. Состав может быть в жидкой, твердой (например, в виде гранул, брикетов, порошка, сухого сыпучего или смачиваемого порошка), аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной форме. Состав может быть составлен (и/или скомбинирован согласно инструкциям) для разбавления (например, композиция представляет собой растворимое твердое вещество или вододиспергируемое твердое вещество), распыления, намазывания, инъекции или нанесения на растение, почву или семена.

В другом аспекте в данном документе представлены наборы, содержащие любую композицию на основе РМР, описанную в данном документе, и инструкции по применению в качестве сельскохозяйственных композиций (например, композиций для борьбы с сорняками, композиций для удобрений или композиций для модификации растений).

В другом аспекте в данном документе представлен способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный ионизируемый липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный ионизируемый липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% ионизируемого липида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV). В некоторых вариантах осуществления экзогенный ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азанедиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200).

В другом аспекте в данном документе представлен способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный цвиттер-ионный липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный цвиттер-ионный липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% цвиттер-ионного липида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV). В некоторых вариантах осуществления экзогенный цвиттер-ионный липид представляет собой 1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC).

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный катионный

липид. В некоторых вариантах осуществления каждый РМР из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления каждый из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% ионизируемого липида. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой С12-200.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный цвиттер-ионный липид. В некоторых вариантах осуществления каждый РМР из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% цвиттер-ионного липида. В некоторых вариантах осуществления цвиттер-ионный липид представляет собой DEPC или DOPC.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии (а) получения совокупности очищенных РМР; (b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и (с) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного катионного липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного катионного липида, с получением модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии (а) получения совокупности очищенных РМР; (b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и (с) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного ионизируемого липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного ионизируемого липида, с получением модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получают посредством способа, который включает стадии (а) получения совокупности очищенных РМР; (b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и (с) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного цвиттер-ионного липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного цвиттер-ионного липида, с получением модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

Другие характеристики и преимущества настоящего изобретения будут очевидны

из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Определения

Используемый в данном документе "приемлемый с точки зрения сельского хозяйства" носитель или вспомогательное вещество представляет собой такой носитель или вспомогательное вещество, которые являются подходящими для применения в сельском хозяйстве, например, для применения по отношению к растениям. В определенных вариантах осуществления приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель или вспомогательное вещество не проявляют выраженных неблагоприятных побочных эффектов по отношению к растению, окружающей среде или людям или животным, которые употребляют полученные сельскохозяйственные продукты, производимые из них, соразмерно с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемые в данном документе термины "доставка" или "приведение в контакт" относятся к нанесению по отношению к растению, животному, грибу или бактерии композиции на основе РМР либо непосредственно на растение, животное, гриб или бактерию, либо рядом с растением, животным, грибом или бактерией, на участке, где композиция является эффективной для изменения приспособленности растения, животного, гриба или бактерии. В способах, где композиция непосредственно контактирует с растением, животным, грибом или бактерией, композиция может быть приведена в контакт со всем растением, животным, грибом или бактерией или только с частью растения, животного, гриба или бактерии.

Используемое в данном документе выражение "снижение приспособленности растения" относится к любому нарушению физиологии растения (например, сорняка) вследствие использования композиции, описанной в данном документе (например, композиции на основе РМР, включающей модифицированные РМР, необязательно содержащие гетерологичное функциональное средство), в том числе без ограничения уменьшение популяции растения (например, сорняка) на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% или больше. Снижение приспособленности растения может быть определено по сравнению с растением, по отношению к которому не использовали композицию.

Используемые в данном документе выражения "эффективное количество", "эффективная концентрация" или "концентрация, эффективная для" относятся к количеству модифицированного РМР или гетерологичного функционального средства в нем, достаточному для обеспечения указанного результата или для достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) в организме-мишени или на нем.

Используемое в данном документе выражение "повышение приспособленности растения" относится к повышению продуктивности растения, например, повышению урожайности, улучшению жизнеспособности растения или качества собранного продукта из этого растения в результате применения композиции, описанной в данном документе (например, композиции на основе РМР, включающей модифицированные РМР,

необязательно содержащие гетерологичное функциональное средство). Повышение урожайности растения относится к повышению урожайности продукта (например, определяемого по биомассе растения, урожаю зерна, семян или плодов, содержанию белка, углеводов или масел или площади листьев) растения на измеримое количество по сравнению с урожайностью того же продукта растения, полученного в тех же условиях, но без применения композиций по настоящему изобретению или по сравнению с применением обычных сельскохозяйственных средств. Например, урожайность может быть повышена на по меньшей мере приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% или более 100%. Урожайность может быть выражена в количестве по массе или объему растения или продукта растения на некоторой основе. Основа может быть выражена с учетом времени, площади выращивания, веса выращенных растений или количества используемого сырья. Повышение приспособленности растения также можно измерять с помощью других средств, таких как повышение или улучшение показателя жизнеспособности, увеличение насаждений (количества растений на единицу площади), увеличение высоты растения, увеличение окружности стебля, увеличение яруса листового полога, улучшение внешнего вида (например, более зеленый цвет листьев, оцениваемый визуально), улучшение оценки корней, увеличение всхожести проростков, содержание белка, увеличение размера листьев, увеличение количества листьев, уменьшение количества мертвых прикорневых листьев, увеличение силы ростков, уменьшение потребности в питательных веществах или удобрениях, увеличение всхожести семян, увеличение урожайности побегов, увеличение цветения, увеличение созревания семян или зерна или зрелости семян, уменьшение ломкости растений (полегание), усиленный рост побегов или любая комбинация этих факторов на измеримую или заметную величину по сравнению с тем же фактором растения, выращенного в тех же условиях, но без введения композиций по настоящему изобретению или с применением обычных сельскохозяйственных средств.

Используемое в данном документе выражение "гетерологичный" относится к средству, которое является либо (1) экзогенным в отношении растения (например, получено из источника, который не является растением, из которого получен РМР), либо (2) эндогенным по отношению к растению, из которого получен РМР, но присутствует в РМР (например, с использованием подходов для загрузки, генетической инженерии, подходов *in vitro* или *in vivo*) в концентрации, которая выше, чем обнаруженная в природе (например, обнаруженная во встречающейся в природе внеклеточной растительной везикуле).

Используемый в данном документе термин "функциональное средство" относится к средству (например, сельскохозяйственному средству (например, пестицидному средству, удобряющему средству, гербицидному средству, средству, модифицирующему

растения) или терапевтическому средству (например, противогрибковому средству, антибактериальному средству, вируцидному средству, противовирусному средству, инсектицидному средству, нематоцидному средству, противопаразитарному средству или репелленту от насекомых)) которое связано или может быть связано с РМР (например, загружено в РМР или на них (например, инкапсулировано, встроено или конъюгировано с РМР) посредством способов *in vivo* или *in vitro* и способно повлиять на указанный результат (например, повышение или снижение приспособленности растения, вредителя растения, симбионта растения, патогена животного (например, человека) или переносчика патогена животного) в соответствии с настоящими композициями или способами.

Используемый в данном документе термин "сельскохозяйственное средство" относится к средству, которое воздействует на растение, вредителя растения или симбионт растения, к такому как пестицидное средство, репеллент от вредителя, удобряющее средство, средство, модифицирующее растения, или средство, модифицирующее симбионт растения.

Используемый в данном документе термин "удобряющее средство" относится к средству, которое способно повышать приспособленность растения (например, питательное вещество для растений или регулятор роста растений) или симбионта растения (например, нуклеиновая кислота или пептид).

Используемый в данном документе термин "пестицидное средство" относится к средству, композиции или веществу в их составе, которое контролирует или снижает приспособленность (например, уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение) сельскохозяйственных, экологических или домашних/бытовых вредителей, таких как насекомое, моллюск, нематода, грибок, бактерия, сорняк или вирус. Под пестицидами понимают встречающиеся в природе или синтетические инсектициды (ларвициды или адультициды), регуляторы роста насекомых, акарициды (митициды), моллюскоциды, нематоциды, эктопаразитоциды, бактерициды, фунгициды или гербициды. Термин "пестицидное средство" может дополнительно охватывать другие биологически активные молекулы, такие как антибиотики, противовирусные пестициды, противогрибковые средства, антигельминтные средства, питательные вещества и/или средства, которые останавливают или замедляют движение насекомых.

Используемый в данном документе термин "средство, модифицирующее растение" относится к средству, которое может изменять генетические свойства (например, повышать экспрессию гена, снижать экспрессию гена или иным образом изменять нуклеотидную последовательность ДНК или РНК) или биохимические свойства растения таким образом, что это приводит к повышению приспособленности растений.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое средство" относится к средству, которое может воздействовать на животное, например, млекопитающее (например, человека), патоген животного или переносчик к патогена, такому как противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство,

противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых.

Используемый в данном документе термин "составленный для доставки по отношению к растению" относится к композиции на основе РМР, которая включает приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель. Используемый в данном документе "приемлемый с точки зрения сельского хозяйства" носитель или вспомогательное вещество представляет собой носитель или вспомогательное вещество, которые подходят для применения в сельском хозяйстве без выраженных неблагоприятных побочных эффектов по отношению к растению, окружающей среде или людям или животным, которые употребляют полученные сельскохозяйственные продукты, производимые из них, соразмерно с приемлемым соотношением польза/риск.

Определенные в данном документе термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к РНК или ДНК, которые являются линейными или разветвленными, одно- или двухнитевыми, 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 более нуклеиновых кислот). Термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Как правило, нуклеотиды в нуклеиновой кислоте связаны посредством фосфодиэфирных связей, хотя термин "нуклеиновая кислота" также охватывает аналоги нуклеиновых кислот, имеющие другие типы связей или остовов (например, 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), среди прочего). 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 "вредитель" относится к организмам, которые причиняют вред растениям или другим организмам, присутствуют там, где они нежелательны, или иным образом наносят ущерб людям, например, воздействуя на способы или продукты сельского хозяйства людей. Вредители могут включать, например, беспозвоночных (например, насекомых, нематод или моллюсков), микроорганизмы (например, фитопатогены, эндофиты, облигатные паразиты, факультативные паразиты или факультативные сапрофиты), таких как бактерии, грибы или вирусы; или сорняки.

Используемые в данном документе термины "пестицидное средство" или "пестицид" относятся к средству, композиции или веществу в их составе, которые контролируют или снижают приспособленность (например, уничтожают или подавляют рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение) сельскохозяйственных,

экологических или домашних/бытовых вредителей, таких как насекомое, моллюск, нематода, гриб, бактерия, сорняк или вирус. Под пестицидами понимают встречающиеся в природе или синтетические инсектициды (ларвициды или адультициды), регуляторы роста насекомых, акарициды (митициды), моллюскициды, нематоциды, эктопаразитициды, бактерициды, фунгициды или гербициды. Термин "пестицидное средство" может дополнительно охватывать другие биологически активные молекулы, такие как антибиотики, противовирусные пестициды, противогрибковые средства, антигельминтные средства, питательные вещества и/или средства, которые останавливают или замедляют движение насекомых.

Пестицидное средство может быть гетерологичным. Используемый в данном документе термин "гетерологичный" относится к средству (например, пестицидному средству), которое является (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 для загрузки, описанных в данном документе) или (2) эндогенным в отношении растительной клетки или ткани, из которых получен РМР, но присутствует в РМР (например, добавлено к РМР с использованием подходов для загрузки, описанных в данном документе, генетической инженерии, подходов *in vitro* или *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 "репеллент" относится к средству, композиции или веществу в их составе, которые удерживают вредителей от приближения к растению или сохранения на нем. Репеллент может, например, уменьшать количество вредителей на растении или в непосредственной близости от него, но не обязательно уничтожать или снижать приспособленность вредителя.

Используемый в данном документе термин "пептид", "белок" или "полипептид" охватывает любую цепь из встречающихся в природе или не встречающихся в природе аминокислот (как D-, так и 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 групп, отличных от аминокислотных (например, углеводных, липидных и т. д.), ковалентно связанных с пептидом, и включает, например, природные белки, синтетические или рекомбинантные полипептиды и пептиды, гибридные молекулы, пептоиды или пептидомиметики.

Используемый в данном документе "процент идентичности" между двумя последовательностями определяют посредством алгоритма BLAST 2.0, который описан в Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно на сайте Национального центра биотехнологической информации.

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, в том числе без ограничения корни, стебли, побеги, листья, пыльцу, семена, плоды, собранный продукт, опухолевую ткань, сок (например, ксилемный сок и флоэмный сок) и различные формы клеток и культуры (например, отдельные клетки, протопласты, зародыши и каллюсная ткань). Растительная ткань может находиться в растении или в органе, ткани или культуре клеток растения.

Используемый в данном документе термин "пакет-мессенджер растений" или "РМР" относится к липидной структуре (например, из липидного бислоя, униламеллярной или мультиламеллярной структуре) (например, везикулярной липидной структуре), которая составляет приблизительно 5-2000 нм в диаметре и содержит или получена из внеклеточной везикулы растения или ее сегмента, части или экстракта, включая любые липидные или нелипидные компоненты (например, пептиды, нуклеиновые кислоты или малые молекулы), связанные с ними. РМР могут необязательно включать дополнительные средства, такие как гетерологичные функциональные средства (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобрительное средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)), в том числе полинуклеотиды, полипептиды или малые молекулы. РМР могут нести дополнительные средства, такие как гетерологичное функциональное средство (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобрительное средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)), или быть связанными с ними посредством разных способов, обеспечивающих доставку дополнительного средства по отношению к целевому растению, например, путем инкапсулирования дополнительного средства, включения компонента в двухслойную липидную структуру или ассоциации компонента (например, путем конъюгации) с поверхностью двухслойной липидной структуры. Дополнительные 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 "модифицированные РМР" относится к композиции, содержащей совокупность РМР, где РМР включают гетерологичное средство (например, средство, способствующее проникновению в клетку), способное повышать

поглощение клетками (например, поглощение растительными клетками, поглощение бактериальными клетками или поглощение клетками гриба) РМР или его части или компонента (например, гетерологичного функционального средства, переносимого РМР) по сравнению с немодифицированным РМР. РМР могут быть модифицированы *in vitro* или *in vivo*.

Используемый в данном документе термин "немодифицированные РМР" относится к композиции, содержащей совокупность РМР, в которых отсутствует гетерологичное средство для поглощения клетками, способное повышать поглощение клетками (например, поглощение животными клетками, поглощение растительными клетками, поглощение бактериальными клетками или поглощение клетками гриба) РМР.

Используемый в данном документе термин "поглощение клетками" относится к поглощению РМР или его части или компонента (например, гетерологичного функционального средства, переносимого РМР) клеткой, такой как клетка животного, растительная клетка, бактериальная клетка или клетка гриба. Например, поглощение может включать перенос РМР или части его компонента из внеклеточной среды внутрь или через клеточную мембрану, клеточную стенку, внеклеточный матрикс или во внутриклеточную среду клетки. Поглощение РМР клетками может происходить посредством активных или пассивных клеточных механизмов.

Используемый в данном документе термин "средство, способствующее проникновению в клетку" относится к средствам, которые изменяют свойства (например, проницаемость) клеточной стенки, внеклеточного матрикса или клеточной мембраны клетки (например, клетки животного, растительной клетки, бактериальной клетки или клетки гриба) таким образом, чтобы способствовать повышению поглощения клеткой по сравнению с клеткой, которая не вступала в контакт с данным средством.

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, растительная малая молекула, 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 ею, либо опосредованно 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 малые молекулы), 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 растительной клеточной стенки; 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).

В некоторых случаях РМР представляет собой РМР, экстрагированный из липидов (LRMP). Используемые в данном документе термины "РМР, экстрагированный из липидов" и "LRMP" относятся к РМР, который был получен из липидной структуры (например, из липидного бислоя, униламеллярной, мультиламеллярной структуры; например, везикулярной липидной структуры), полученной (например, обогащенной, выделенной или очищенной) из растительного источника, где липидную структуру разрушают (например, разрушают путем экстракции липидов) и повторно собирают или восстанавливают в жидкой фазе (например, жидкой фазе, содержащей груз) с использованием стандартных способов, например, восстанавливают посредством способа, включающего гидратацию липидной пленки и/или введение растворителя с получением LRMP, описанного в данном документе. При необходимости в способ можно дополнительно включать обработку ультразвуком, обработку замораживанием/оттаиванием и/или экструзию липидов, например, для уменьшения

размера восстановленных РМР. РМР (например, LPMP) может содержать от 10% до 100% липидов, полученных из липидной структуры из растительного источника, например, может содержать 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%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% липидов, полученных из липидной структуры из растительного источника. РМР (например, LPMP) может содержать все или часть видов липидов, присутствующих в липидной структуре из растительного источника, например, он может содержать 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%, по меньшей мере 90% или 100% разновидностей липидов, присутствующих в липидной структуре из растительного источника. РМР (например, LPMP) может не содержать, содержать часть или содержать все виды белка, присутствующие в липидной структуре из растительного источника, например, может содержать 0%, менее 1%, менее 5%, менее 10%, менее 15%, менее 20%, менее 30%, менее 40%, менее 50%, менее 60%, менее 70%, менее 80%, менее 90%, менее 100% или 100% разновидностей белка, присутствующих в липидной структуре из растительного источника. В некоторых случаях липидный бислой РМР (например, LPMP) не содержит белков. В некоторых случаях липидная структура РМР (например, LPMP) содержит меньшее количество белков по сравнению с липидной структурой из растительного источника.

РМР (например, LPMP) могут необязательно содержать экзогенные липиды, например, липиды, которые являются (1) экзогенными в отношении растения (например, получены из источника, который не является растением или частью растения, из которых получен РМР) (например, добавлены к РМР с использованием способов, описанных в данном документе) или (2) эндогенными в отношении растительной клетки или ткани, из которых получен РМР, но присутствуют в РМР (например, добавлены к РМР с использованием способов, описанных в данном документе, генетической инженерии, подходов *in vitro* или *in vivo*) в концентрации, которая превышает обнаруженную в природе (например, превышает концентрацию, обнаруженную во встречающейся в природе внеклеточной растительной везикуле). Липидная композиция РМР может включать 0%, менее 1% или по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более 95% экзогенных липидов. Иллюстративные экзогенные липиды включают катионные липиды, ионизируемые липиды и цвиттер-ионные липиды. Экзогенный липид может представлять собой средство, способствующее проникновению в клетку.

РМР необязательно могут содержать дополнительные средства, такие как гетерологичные функциональные средства, например, средства, способствующие проникновению в клетку, пестицидные средства, удобрения, средства, модифицирующие растения, терапевтические средства, полинуклеотиды, полипептиды или малые молекулы. РМР могут нести дополнительные средства или могут быть ассоциированы с ними

(например, гетерологичными функциональными средствами) различными путями для обеспечения доставки средства по отношению к целевому растению, например, посредством инкапсулирования средства, включения средства в структуру из липидного бислоя или ассоциации средства (например, посредством конъюгации) с поверхностью структуры из липидного бислоя. 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 "катионный липид" относится к амфифильной молекуле (например, липиду или липидоиду), содержащей катионную группу (например, катионную группу головки молекулы).

Используемый в данном документе термин "липидоид" относится к молекуле, обладающей одной или несколькими характеристиками липида.

Используемый в данном документе термин "ионизируемый липид" относится к амфифильной молекуле (например, липиду или липидоиду), содержащей группу (например, группу головки молекулы), которая может быть ионизирована, например, диссоциирована с получением одного или нескольких электрически заряженных фрагментов при заданных условиях (например, pH).

Используемый в данном документе термин "цвиттер-ионный липид" относится к амфифильной молекуле (например, липиду или липидоиду), содержащей группу (например, группу головки молекулы) с по меньшей мере одним фрагментом, имеющим положительный заряд, и по меньшей мере одним фрагментом, имеющим отрицательный заряд, где суммарный заряд группы равен нулю.

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 некоторого 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, в ходе получения или составления), необязательно в определенном диапазоне температуры (например, температуры, 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 проникать через клеточную стенку, и/или пестицидной, и/или репеллентной активности) по сравнению с исходной активностью РМР (например, в ходе 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 "составленный для доставки по отношению к животному" относится к композиции на основе РМР, которая включает фармацевтически приемлемый носитель. Используемые в данном документе "фармацевтически приемлемый" носитель или вспомогательное вещество представляет собой такой носитель или вспомогательное вещество, которые подходят для введения животному (например, человеку), например, без выраженных побочных эффектов для животного (например, человека).

Используемое в данном документе выражение "необработанный" относится к растению, животному, грибу или бактерии, которые не были приведены в контакт с композицией на основе РМР, описанной в данном документе, или которым ее не доставляли, включая отдельное растение, животное, гриб или бактерию, которым не осуществляли доставку композиции на основе РМР, то же растение, животное, гриб или бактерию, подвергнутые обработке, оцениваемые в момент времени до доставки композиции на основе РМР, или то же растение, животное, гриб или бактерию, подвергнутые обработке, оцениваемые по необработанной части растения, животного, гриба или бактерии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** представлена схематическая диаграмма, показывающая технологический процесс получения РМР с восстановленными липидами (LPMP) из РМР грейпфрута и лимона.

На **фиг. 2** представлен график, показывающий относительное количество частиц заданного размера (нм) в LPMP; LPMP с добавлением DC-холестерина (DC-хол.) и LPMP с добавлением DOTAP (DOTAP). Данные получены посредством NanoFCM с использованием стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

На **фиг. 3А** представлена микрофотография, полученная посредством криоэлектронной микроскопии, на которой показаны LPMP, восстановленные из экстрагированных липидов РМР лимона. Масштабная метка: 500 нм.

На **фиг. 3В** представлен график, показывающий относительное количество частиц заданного эквивалентного сферического диаметра (нм) в LPMP, восстановленных из экстрагированных липидов лимона, при измерении посредством криоэлектронной микроскопии.

На **фиг. 4А** представлен график, на котором показан дзета-потенциал (мВ) LPMP, не содержащих добавленных липидов (LPMP), и LPMP, содержащих 25% или 40% DOTAP или DC-холестерина, при измерении с использованием динамического рассеяния света (DLS). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

На **фиг. 4В** представлена гистограмма, на которой показан процент ввода siRNA, меченной Alexa Fluor 555, которая была извлечена из LPMP после загрузки LPMP из липидов грейпфрута, не содержащих добавленных липидов (LPMP), и LPMP из липидов грейпфрута, содержащих 20% DOTAP.

На **фиг. 4С** представлена гистограмма, на которой показан процент ввода tracrRNA, меченной АТТО, которая была извлечена из LPMP после загрузки LPMP из липидов лимона, не содержащих добавленных липидов (LPMP), и LPMP из липидов лимона, содержащих 40% DC-холестерина (DC-хол.).

На **фиг. 4D** представлена гистограмма, на которой показана концентрация tracrRNA (мкг/мл) в LPMP, содержащих 40% DC-холестерина, которые не подвергались обработке или были лизированы с использованием Triton-X100 и гепарина (+TX+гепарин), полученная при измерении посредством анализа Quant-iT™ RiboGreen®.

На **фиг. 5** представлен набор микрофотографий, показывающих флуоресценцию DAPI (верхний ряд) и РКН67 (центральный ряд) в клетках COLO697, обработанных РКН67-мечеными LPMP из липидов грейпфрута, не содержащих добавленных липидов (центральный столбец), и LPMP, содержащих 20% DOTAP (правый столбец). Объединенное изображение, содержащее сигналы DAPI и РКН67, показано в нижнем ряду панелей. Клетки, обработанные красителем РКН67, показаны в качестве контроля. Масштабная метка: 50 мкм.

На **фиг. 6** представлен набор микрофотографий, показывающих фазово-контрастное изображение (левый столбец), флуоресценцию АТТО 550 (центральный столбец) и объединенные изображения клеток маиса Black Mexican Sweet (BMS), обработанных LPMP, не содержащими добавленных липидов (центральный ряд), и LPMP, содержащими 40% DC-холестерина (DC-хол.). Клетки, которые обработали только H₂O, представлены в качестве отрицательного контроля (верхние панели). Поглощение клеткой LPMP или LPMP, модифицированных DC-холестерином, определяют по наличие сигнала tracrRNA АТТО 550 в клетке. Масштабная метка: 100 мкм.

На **фиг. 7** представлен график, показывающий относительное количество частиц заданного размера (нм) в немодифицированных LPMP; LPMP с добавлением MC3 и LPMP с добавлением C12-200. Данные получены посредством NanoFCM с использованием стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

На **фиг. 8А** представлен график, показывающий дзета-потенциал (мВ) LPMP, не содержащих добавленных липидов (LPMP), при pH 7, LPMP, содержащих 40% MC3, при pH 4 и pH 7, и LPMP, содержащих 25% C12-200 при pH 4 и pH 7. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

На **фиг. 8В** представлена гистограмма, показывающая процент ввода tracrRNA,

меченной АТТО 550, которая была извлечена из LPMP после загрузки LPMP из липидов лимона, не содержащих добавленных липидов (LPMP), при pH 7, LPMP, содержащих 40% МСЗ, при pH 4 и pH 9, и LPMP, содержащих 25% С12-200, при pH 4 и pH 9. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

На **фиг. 8С** представлена гистограмма, на которой показана концентрация sgRNA (мкг/мл) в LPMP, содержащих 25% С12-200, которые не подвергались обработке или были лизированы с использованием Triton-X100 и гепарина (+TX+гепарин), полученная при измерении посредством анализа Quant-iTTM RiboGreen®.

На **фиг. 9** представлен набор микрофотографий, показывающих фазово-контрастное изображение (левый столбец), флуоресценцию АТТО 550 (центральный столбец) и объединенные изображения клеток маиса Black Mexican Sweet (BMS), обработанных LPMP из липидов лимона, не содержащими добавленных липидов (центральный ряд), и LPMP, содержащими 25% С12-200 (нижний ряд). Клетки, которые обработали только H₂O, представлены в качестве отрицательного контроля (верхний ряд). Поглощение клеткой LPMP или LPMP, модифицированных С12-200, определяют по наличию сигнала tracrRNA АТТО 550 в клетке. Масштабная метка: 100 мкм.

На **фиг. 10** представлен набор микрофотографий, показывающих фазово-контрастное изображение (верхний ряд), флуоресценцию Alexa Fluor 488, указывающую на меченую целлюлазу (второй ряд), флуоресценцию РКН26, указывающую на меченые мембраны РМР (третий ряд), и объединенные изображения (нижний ряд) клеток маиса Black Mexican Sweet (BMS), обработанных LPMP из липидов грейпфрута, не содержащих добавленной целлюлазы (четвертый столбец). Поглощение LPMP или LPMP, модифицированных целлюлазой с использованием протоколов модификации с.1 (РМР, конъюгированные с AlexaFluor488-целлюлазой посредством карбодиимидной химии с использованием кросс-линкера EDC), b.3 (РМР, конъюгированные с AlexaFluor488-целлюлазой с использованием линкера NH₂-DBCO), b.2 (РМР, конъюгированные с AlexaFluor488-целлюлазой с использованием линкера NH₂-DBCO) или b.1 (РМР, конъюгированные с AlexaFluor488-целлюлазой с использованием NHS-фосфина). Захват модифицированных целлюлазой РМР определяется по присутствию сигнала флуоресценции РКН26 в клетках. Масштабная метка: 100 мкм.

Подробное описание

В данном документе представлены модифицированные пакеты-мессенджеры растений (РМР), которые увеличивают поглощение клетками, например, клеткой животного (например, клеткой млекопитающего, например, клеткой человека), растительной клеткой, бактериальной клеткой или клеткой гриба. РМР представляют собой липидные структуры, получаемые полностью или частично из растительных внеклеточных везикул (EV) или их сегментов, частей или экстрактов. РМР могут необязательно включать дополнительные средства (например, гетерологичные функциональные средства (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобряющее средство, гербицидное средство, средство,

модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)). Модифицированные РМР и родственные композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать в различных сельскохозяйственных и терапевтических способах.

I. Композиции на основе модифицированных пакетов-мессенджеров растений

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, содержат совокупность модифицированных пакетов-мессенджеров растений (РМР). РМР представляет собой липидную (например, из липидного бислоя, 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 липидного бислоя, которая встречается в естественных условиях в растении и имеет диаметр приблизительно 5-2000 нм. Растительные EV могут возникать в ходе 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 представлять собой обогащенные растительные EV, обнаруженные в средах для культивирования клеток при секреции из растительных клеток. Растительные EV могут быть отделены от растений с получением таким образом РМР посредством множества способов, дополнительно описанных в данном документе. Кроме того, РМР могут необязательно включать гетерологичное функциональное средство ((например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобряющее средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, средство, способствующее проникновению в клетку, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)), которые можно вводить *in vivo* или *in vitro*.

РМР могут включать растительные EV или их сегменты, части или экстракты. Необязательно РМР также могут включать экзогенные липиды (например, стеролы (например, холестерин), катионные липиды, цвиттер-ионные липиды или ионизируемые липиды) в дополнение к липидам, полученным из растительных EV. В некоторых вариантах осуществления растительные EV характеризуются диаметром, составляющим приблизительно 5-1000 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 1000 нм, менее 950 нм, менее 900 нм, менее 850 нм, менее 800 нм, менее 750 нм, менее 700 нм, менее 650 нм, менее 600 нм, менее 550 нм, менее 500 нм, менее 450 нм, менее 400 нм, менее 350 нм, менее 300 нм, менее 250 нм, менее 200 нм, менее 150 нм, менее 100 нм или менее 50 нм. Для измерения диаметра частицы растительной EV или ее сегмента, части или экстракта можно использовать различные способы (например, способ динамического светорассеяния), стандартные в данной области техники.

В некоторых случаях РМР может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средняя площадь поверхности которых составляет от 77 нм^2 до $3,2 \times 10^6 \text{ нм}^2$ (например, $77-100 \text{ нм}^2$, $100-1000 \text{ нм}^2$, $1000-1 \times 10^4 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^4-1 \times 10^5 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^5-1 \times 10^6 \text{ нм}^2$ или $1 \times 10^6-3,2 \times 10^6 \text{ нм}^2$). 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, $65-100 \text{ нм}^3$, $100-1000 \text{ нм}^3$, $1000-1 \times 10^4 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^4-1 \times 10^5 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^5-1 \times 10^6 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^6-1 \times 10^7 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^7-1 \times 10^8 \text{ нм}^3$, $1 \times 10^8-5,3 \times 10^8 \text{ нм}^3$). 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 5-2000 нм. Например, средний диаметр РМР может составлять 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 1000-1200 нм, приблизительно 1200-1400 нм, приблизительно 1400-1600 нм, приблизительно 1600-1800 нм или приблизительно 1800-2000 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 нм^2 до $1,3 \times 10^7 \text{ нм}^2$ (например, $77-100 \text{ нм}^2$, $100-1000 \text{ нм}^2$, $1000-1 \times 10^4 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^4-1 \times 10^5 \text{ нм}^2$,

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

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 100% (например, менее 90%, менее 80%, менее более 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 10%, менее 5% или менее 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 77 нм^2 , 100 нм^2 , 1000 нм^2 , $1 \times 10^4 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^5 \text{ нм}^2$, $1 \times 10^6 \text{ нм}^2$ или $3,2 \times 10^6 \text{ нм}^2$). В некоторых случаях площадь поверхности сегмента, части или экстракта EV составляет менее 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 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 использованием хлороформа) из растительной EV, РМР может содержать по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более 99% липидов, экстрагированных (например, с использованием 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 модифицированных 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.

В некоторых случаях совокупность РМР может быть выделена из растения посредством 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 характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце (например, уровнем, который снижен 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 совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV (например, уровнем, который снижен 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, представленные в данном документе, могут содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, полученные из множества растений. РМР могут быть получены из растений любых родов (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 с использованием сосудистого растения, например, однодольных, двудольных или голосеменных. Например, РМР могут быть получены с использованием люцерны, яблони, растения рода *Arabidopsis*, банана, ячменя, видов из рода *Brassica* (например, *Arabidopsis thaliana* или *Brassica napus*), канолы, клещевины, цикория, хризантемы, клевера, какао, кофе, хлопчатника, семени хлопчатника, кукурузы, крамбе, клюквы, огурца, дендробиума, диоскореи, эвкалипта, овсяницы, льна, гладиолуса, растения семейства лилейных, семени льна, проса, дыни, горчицы, овса, масличной пальмы, масличного рапса, папайи, арахиса, ананаса, декоративных растений, фасоли, картофеля, рапса, риса, ржи, райграса, 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, pekan, 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, клещевинной, 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 с использованием целого 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 с использованием 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, опухоловой 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 с использованием 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 с использованием 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 с использованием растения или его части посредством различных способов. Любой способ, который позволяет высвобождать апопластную фракцию растения, содержащую EV, или иную внеклеточную фракцию, которая содержит РМР, содержащие секретируемые EV (например, среды для культивирования клеток), является подходящим в способах по настоящему изобретению. EV можно отделять от растения или части растения 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 вакуумную инфльтрацию растения (например, с использованием буфера для выделения везикул) для высвобождения и сбора апопластной фракции. В качестве альтернативы стадия выделения может включать гомогенизацию или измельчение растения для высвобождения растительных EV с получением таким образом 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 посредством центрифугирования (например, дифференциального центрифугирования или ультрацентрифугирования) и/или фильтрации для отделения растительной фракции, содержащей РМР, от крупных контаминантов, включая дебрис растительных тканей или растительные клетки. Таким образом, фракция неочищенных РМР будет содержать пониженное количество крупных контаминантов, включая дебрис растительных тканей или растительные клетки, по сравнению с исходным образцом из растения или части растения. В зависимости от используемого способа фракция неочищенных РМР может дополнительно содержать пониженный уровень органелл растительной клетки (например, ядер, митохондрий или хлоропластов) по сравнению с

исходным образцом из растения или части растения.

В некоторых случаях стадия выделения 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 растительных клеток или клеточного дебриса. В таких случаях фракция неочищенных РМР будет содержать пониженное количество растительных клеток или клеточного дебриса 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), и/или использования других подходов для удаления агрегированных компонентов (например, осаждения или эксклюзионной хроматографии). Полученные чистые РМР могут содержать сниженный уровень контаминантов или других нежелательных компонентов из исходного растения (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 значением порогового уровня, например, спецификацией коммерческого выпуска. Например, чистые РМР могут характеризоваться пониженным уровнем (например, пониженным на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или на более чем 100%; или в приблизительно 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, в 100 раз или в более чем 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 РМР. Например, РМР могут быть получены в диапазоне значений показателя рН (например, в соответствии с измерением посредством рН-зонда) с осаждением белковых агрегатов в растворе. Значение рН может быть доведено, например, до рН 3, рН 5, рН 7, рН 9 или рН 11

посредством добавления, например, гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты. Как только раствор достигнет указанного значения pH, его можно фильтровать для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы РМР можно подвергать флокуляции путем 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 солюбилизовать посредством повышения концентрации соли. Например, NaCl можно добавлять к 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, 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.

В ходе процесса получения РМР необязательно могут быть получены таким образом, чтобы РМР характеризовались повышенной концентрацией (например, повышенной 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, в 100 раз или в более чем 100 раз) по сравнению с уровнем EV в контрольном или исходном образце. Содержание РМР может составлять от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% композиции, 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 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, в соответствии с измеренным 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 сельского хозяйства, например, концентрированного состава сверхмалого объема.

Как проиллюстрировано в примере 1, РМР могут быть получены с использованием множества растений или их частей (например, апопласта листа, апопласта семян, корня, плода, овоща, пыльцы, флоэмного или ксилемного сока). Например, РМР могут быть извлечены из апопластной фракции растения, такой как апопласт листа (например, апопласт листьев *Arabidopsis thaliana*) или апопласт семян (например, апопласт семян подсолнечника). Другие иллюстративные РМР получают с использованием 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.

РМР можно модифицировать перед использованием, как это описано далее в данном документе.

В. Модифицированные РМР и композиции на основе РМР

После получения РМР эти РМР можно модифицировать путем загрузки или составления с гетерологичным средством (например, средством, способствующим проникновению в растительные клетки), которое способно повышать поглощение клетками (например, поглощение клетками животных (например, поглощение клетками млекопитающих, например, поглощение клетками человека), поглощение растительными клетками, поглощение бактериальными клетками или поглощение клетками гриба) по сравнению с немодифицированным РМР. Например, модифицированные РМР могут включать (например, быть загружены, например, инкапсулированы или конъюгированы с) или составлены (например, суспендированы или ресуспендированы в растворе, содержащем) средство, способствующее проникновению в клетку, такое как фермент, детергент, ионная жидкость на основе фтористого соединения или цвиттер-ионная жидкость или липид.

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой фермент. Например, фермент может быть ферментом животных, бактерий, грибов, простейших, млекопитающих или растений, который способен расщеплять клеточные стенки (например, клеточную стенку животного, растительную клеточную стенку, бактериальную клеточную стенку или клеточную стенку гриба).

В некоторых случаях фермент представляет собой бактериальный фермент, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых случаях фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериального фермента, способного расщеплять растительные клеточные стенки, или ее частью. В некоторых случаях фермент представляет собой фермент гриба, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых случаях фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента гриба, способного расщеплять растительные клеточные стенки, или ее частью. В некоторых случаях фермент представляет собой растительный фермент, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых случаях расщепляющий клеточные стенки фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью растительного фермента, способного расщеплять растительные клеточные стенки, или ее частью. В некоторых случаях фермент представляет собой фермент простейших, способный расщеплять растительные клеточные стенки. В некоторых случаях фермент,

характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента простейших, способного расщеплять клеточные стенки гриба, или ее частью.

В некоторых случаях фермент представляет собой фермент животных, способный расщеплять внеклеточный матрикс животных (например, внеклеточный матрикс млекопитающих, например, внеклеточный матрикс человека).

В некоторых случаях фермент представляет собой целлюлазу. Например, целлюлаза может характеризоваться по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериальной целлюлазы или ее частью. В некоторых случаях целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы гриба или ее частью. В некоторых случаях целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы простейшего или ее частью.

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой детергент. В некоторых вариантах осуществления детергент представляет собой сапонин или 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS).

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клеточную стенку, представляет собой ионную жидкость. В некоторых вариантах осуществления ионная жидкость представляет собой ацетат 1-этил-3-метилимидазолия (ацетат EMIM). В других вариантах осуществления ионная жидкость представляет собой ацетат BMIM, ацетат NMIM, ацетат MMIM или ацетат AllylMIM.

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой жидкость на основе фтористого соединения. В некоторых вариантах осуществления жидкость на основе фтористого соединения представляет собой перфтороктан. В других вариантах осуществления жидкость на основе фтористого соединения представляет собой перфторгексан или перфтор(метилдекалин).

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой катионный липид. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой DC-холестерин или диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP).

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азанедиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200) или (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат, DLin-MC3-DMA (MC3). В некоторых случаях PMP содержат по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% или более 90% ионизируемого липида (например, C12-200 или МСЗ).

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой цвиттер-ионный липид. В некоторых вариантах осуществления цвиттер-ионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC) или 1,2-дизрукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC). В некоторых случаях РМР содержат по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% цвиттер-ионного липида (например, DOPC или DEPC).

Средство может повышать поглощение РМР в целом или может увеличивать поглощение части или компонента РМР, такого как гетерологичное функциональное средство (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобряющее средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)), переносимое РМР. Степень, до которой повышается поглощение клетками (например, поглощение растительными клетками, поглощение бактериальными клетками или поглощение клетками гриба), может варьироваться в зависимости от растения или части растения, в которую доставляется композиция, состава РМР и других модификаций, внесенных в РМР. Например, модифицированные РМР могут характеризоваться повышенным поглощением клетками (например, поглощением клетками животных, поглощением растительными клетками, поглощением бактериальными клетками или поглощением клетками гриба) на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% по сравнению с немодифицированными РМР. В некоторых случаях повышенное поглощение клетками (например, поглощение клетками животных, поглощение растительными клетками, поглощение бактериальными клетками или поглощение клетками гриба) представляет собой повышенное в по меньшей мере 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз или 1000 раз поглощение клетками по сравнению с немодифицированным РМР.

В другом аспекте РМР могут быть модифицированы с использованием других компонентов (например, липидов, например, стеринов, например, холестерина; или малых молекул) для дополнительного изменения функциональных и структурных характеристик РМР. Например, РМР можно дополнительно модифицировать посредством 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).

Поглощение клетками модифицированных РМР можно измерить посредством множества способов, известных в данной области техники. Например, РМР или их компонент можно метить маркером (например, флуоресцентным маркером), который может быть обнаружен в выделенных клетках для подтверждения поглощения. Например,

поглощение клетками можно определить на основе показателей приспособленности, например приспособленности животного, растения, бактерии или гриба, содержащего обработанную клетку. Например, эффективность композиций и способов по настоящему изобретению можно определить путем сравнения изменений приспособленности организмов, обработанных модифицированными по настоящему изобретению РМР, по сравнению с обработками композициями, не содержащими модифицированные РМР.

С. Маркеры растительной EV

РМР из композиций и способов по настоящему изобретению могут содержать ряд маркеров, которые позволяют идентифицировать РМР в качестве полученных с использованием растительной EV и/или содержащих 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 EV или в ее поверхность *in planta*, такому как растительный белок, растительная нуклеиновая кислота, растительная малая молекула, 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.

В некоторых случаях маркер растительной EV может включать растительный липид. Примеры растительных липидных маркеров, которые можно обнаружить в РМР, включают фитостерин, кампестерин, β -ситостерин, стигмастерин, авенастерин, гликозилинозитолфосфорилцерамиды (GIPC), гликолипиды (например, моногалактозилдиацилглицерин (MGDG) или дигалактозилдиацилглицерин (DGDG)) или их комбинацию. Например, РМР 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 синаптогамин 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, обладают несколькими общими свойствами, такими как (i) отсутствие лидерной последовательности, (ii) отсутствие посттрансляционных модификаций (PTM), специфических для ER или аппарата Гольджи, и/или (iii) секреция, на которую не оказывает влияния брефельдин 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 РНА. 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 защитных соединений растений, 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 PMP, 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 PMP также могут быть идентифицированы в качестве полученных с использованием растительных EV на основе отсутствия определенных маркеров (например, липидов, полипептидов или полинуклеотидов), которые, как правило, не синтезируются растениями, но обычно ассоциированы с другими организмами (например, маркеры животных EV, растительных EV, бактериальных EV или грибковых EV). Например, в некоторых случаях PMP не содержит липидов, которые обычно встречаются в животных EV, бактериальных EV или грибковых EV. В некоторых случаях PMP не содержит липидов, типичных для животных EV (например, сфингомиелина). В некоторых случаях PMP 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 малые молекулы (например, с использованием масс-спектропии, масс-спектрометрии), липиды (например, с использованием масс-спектропии, масс-спектрометрии), белки (например, с использованием масс-спектропии, иммуноблоттинга) или нуклеиновые кислоты (например, с использованием ПЦР-анализа). 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.

D. Загрузка средств

РМР могут быть модифицированы с включением гетерологичного функционального средства, например, средства, способствующего проникновению в клетку, и/или гетерологичного сельскохозяйственного средства (например, пестицидного средства, удобрения, гербицидного средства, средства, модифицирующего растения) или гетерологичного терапевтического средства (например, противогрибкового средства, антибактериального средства, вируцидного средства, противовирусного средства, инсектицидного средства, нематоцидного средства, противопаразитарного средства или репеллента от насекомых)), такого как описанные в данном документе. РМР могут нести такие средства или могут быть ассоциированы с ними посредством различных способов для обеспечения доставки средства по отношению к целевому организму (например, целевому животному, растению, бактерии или грибу), например, посредством инкапсулирования средства, включения компонента в структуру из бислоя липидов или ассоциации компонента (например, посредством конъюгации) с поверхностью структуры РМР из бислоя липидов. В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство (например, средство, способствующее проникновению в клетку) включено в состав РМР, как это описано в разделе IV данного документа.

Гетерологичное функциональное средство может быть включено или загружено в или на РМР посредством любых способов, известных в данной области техники, которые непосредственно или опосредованно обеспечивают ассоциацию РМР и средства. Гетерологичные функциональные средства можно включать в РМР посредством 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 посредством способов как *in vivo*, так и *in vitro*.

В тех случаях, когда РМР загружают гетерологичным функциональным средством (например, гетерологичным сельскохозяйственным средством (например, пестицидным средством, удобрением, гербицидным средством, средством, модифицирующим растения) или гетерологичным терапевтическим средством (например, противогрибковым средством, антибактериальным средством, вируцидным средством,

противовирусным средством, инсектицидным средством, нематоцидным средством, противопаразитарным средством или репеллентом от насекомых)) *in vivo*, РМР могут быть получены с использованием EV, или их сегментов или частей, или экстракта, содержащего EV, который был загружен *in planta*. Способы *in planta* включают экспрессию гетерологичного функционального средства (например, гетерологичного сельскохозяйственного средства (например, пестицидного средства, удобрения средства, гербицидного средства, средства, модифицирующего растения) или гетерологичного терапевтического средства (например, противогрибкового средства, антибактериального средства, вируцидного средства, противовирусного средства, инсектицидного средства, нематоцидного средства, противопаразитарного средства или репеллента от насекомых)) в растении, которое было генетически модифицировано для экспрессии гетерологичного функционального средства для загрузки в EV. В некоторых случаях гетерологичное функциональное средство является экзогенным для растения. В качестве альтернативы гетерологичное функциональное средство может встречаться в растении в природе, но сконструировано для экспрессии 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, в культуре ткани или в культуре клеток). Например, гетерологичное функциональное средство можно вводить в РМР посредством одного или нескольких из электропорации, обработки ультразвуком, пассивной диффузии, перемешивания, экстракции липидов или экструзии. Загруженные РМР можно оценивать для подтверждения присутствия или количества загруженного средства посредством различных способов, таких как HPLC (например, для оценки малых молекул); иммуноблоттинг (например, для оценки белков); и/или 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 гетерологичных функциональных средств могут быть химически связаны с РМР таким образом, что одно или несколько гетерологичных функциональных средств присоединяются (например, посредством ковалентных или ионных связей) непосредственно к бислою липидов РМР. В некоторых случаях конъюгация различных гетерологичных функциональных средств с РМР может быть достигнута посредством исходного 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 вступает в реакцию 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 гетерологичного функционального средства, конъюгированного с РМР. В качестве части объединения смеси с градиентом сахарозы и сопутствующей стадии центрифугирования РМР, конъюгированные с гетерологичными функциональными средствами, затем выявляются в виде полосы в градиенте сахарозы таким образом, что конъюгированные РМР могут быть собраны, промыты и растворены в подходящем растворе для применения, как это описано в данном документе.

В некоторых случаях РМР стабильно ассоциированы с гетерологичным функциональным средством до и после доставки РМР, например, по отношению к растению. В других случаях РМР ассоциированы с гетерологичным функциональным средством таким образом, что гетерологичное функциональное средство становится диссоциированным от РМР после доставки РМР, например, по отношению к растению.

РМР могут быть загружены или композиция на основе РМР может быть составлена с различными концентрациями гетерологичного функционального средства в зависимости от конкретного средства или варианта применения. Например, в некоторых случаях РМР загружены или композиция на основе РМР составлена так, что композиция на основе РМР, раскрытая 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 в любом диапазоне от приблизительно 0,001 до 95) или больше вес. % гетерологичного функционального средства. В некоторых случаях РМР загружены или композиция на основе РМР составлена так, что композиция на основе РМР содержит 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 или 0,001 (или в любом диапазоне от приблизительно 95 до 0,001) или меньше вес. % гетерологичного функционального средства. Например, композиция на основе РМР 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. % гетерологичного функционального средства. В некоторых случаях РМР может быть загружен или композиция на основе РМР составлена с приблизительно 1, 5, 10, 50, 100, 200 или 500, 1000, 2000 (или в любом диапазоне от приблизительно 1 до 2000) или больше мкг/мл гетерологичного функционального средства. РМР по настоящему изобретению может быть загружен или композиция на основе РМР может быть составлена с приблизительно 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1 (или в любом диапазоне от приблизительно 2000 до 1) или меньше мкг/мл

гетерологического функционального средства.

В некоторых случаях РМР загружены или композиция на основе РМР составлена так, что композиция на основе РМР, 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. % гетерологического функционального средства. В некоторых случаях РМР может быть загружен или композиция на основе РМР может быть составлена с 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 гетерологического функционального средства.

В некоторых случаях композицию на основе РМР составляют с гетерологическим функциональным средством путем суспендирования РМР в растворе, содержащем гетерологическое функциональное средство или состоящем из него, например, суспендирования или ресуспендирования РМР путем интенсивного перемешивания. Гетерологическое функциональное средство (например, средство, способствующее проникновению в клетку, например, фермент, детергент, ионная жидкость на основе фтористого соединения или цвиттер-ионная жидкость или липид) может содержать, например, менее 1% или по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% раствора.

Примеры конкретных гетерологических функциональных средств, которые могут быть загружены в РМР, дополнительно описаны в разделе, озаглавленном «Гетерологические функциональные средства»

Е. Дзета-потенциал

Композиция на основе РМР может характеризоваться, например, дзета-потенциалом, составляющим более -30 мВ при отсутствии груза, более -20 мВ, более -5 мВ, более 0 мВ или приблизительно 30 мВ при отсутствии груза. В некоторых примерах композиция на основе РМР характеризуется отрицательным дзета-потенциалом, например, дзета-потенциалом, составляющим менее 0 мВ, менее -10 мВ, менее -20 мВ, менее -30 мВ, менее -40 мВ или менее -50 мВ при отсутствии груза. В некоторых примерах композиция на основе РМР характеризуется положительным дзета-потенциалом, например, дзета-потенциалом, составляющим более 0 мВ, более 10 мВ, более 20 мВ, более 30 мВ, более 40 мВ или более 50 мВ при отсутствии груза. В некоторых примерах композиция на основе РМР характеризуется величиной дзета-потенциала, составляющей приблизительно 0.

Дзета-потенциал композиции на основе РМР можно измерить посредством любого способа, известным в данной области техники. Значения дзета-потенциалов обычно измеряют опосредованно, например, рассчитывают с использованием теоретических моделей на основе данных, полученных посредством способов и технологий, известных в данной области техники, например, электрофоретической подвижности или динамической электрофоретической подвижности. Электрофоретическую подвижность обычно измеряют посредством микроэлектрофореза, электрофоретического рассеяния света или регулируемого резистивного импульсного зондирования. Электрофоретическое рассеяние света основано на динамическом рассеянии света. Как правило, значения дзета-потенциалов доступны при измерениях динамического рассеяния света (DLS), также известного как фотонная корреляционная спектроскопия или квазиупругое рассеяние света.

F. Составы

i. Составы для применения в сельском хозяйстве

Для облегчения нанесения, обработки, транспортировки, хранения и эффективной активности РМР (например, модифицированные РМР, описанные в данном документе) могут быть составлены 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).

Композиции на основе РМР можно применять в виде водных суспензий или эмульсий, приготовленных 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 уплотнять с образованием вододиспергируемых гранул, содержат однородную смесь композиции на основе РМР, носителя и поверхностно-активных веществ. Носитель обычно выбирают 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 неионогенных поверхностно-активных веществ.

Водные суспензии включают суспензии водонерастворимых композиций на основе РМР, диспергированных в водном носителе в концентрации в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 50% по весу. Суспензии получают посредством тонкого измельчения композиции и ее 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.

Композиции на основе РМР также можно применять в виде гранулированных композиций, которые особенно применимы для внесения в почву. Гранулированные композиции обычно содержат от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по весу композиции на основе РМР, диспергированной 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 содержит масляные глобулы, каждая из которых имеет ламеллярное жидкокристаллическое покрытие и диспергирована в водной фазе, где каждая масляная глобула содержит по меньшей мере одно соединение, которое является активным с точки зрения сельского хозяйства, и индивидуально покрыта мономолекулярным или олигомолекулярным слоем, содержащим: (1) по меньшей мере одно неионогенное липофильное поверхностно-активное средство, (2) по меньшей мере одно неионогенное гидрофильное поверхностно-активное средство и (3) по меньшей мере одно ионное поверхностно-активное средство, где глобулы имеют средний диаметр частиц, составляющий менее 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 исключающий 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 предотвращает их повторную агрегацию. Диспергирующие средства добавляют к

агрехимическим 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, неионогенные 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. Неионогенные 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 EO-PO (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 EO-PO.

Солубилизирующее 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 композиции на основе РМР в отношении мишени. Типы поверхностно-активных веществ, используемых для биологического усиления, обычно зависят от природы и механизма действия композиции на основе РМР. Однако они часто представляют собой неионогенные 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 композиции на основе РМР 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 С9 и С10 ароматических растворителей. Хлорированные углеводороды пригодны в качестве соразтворителей для предупреждения кристаллизации композиции на основе РМР 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 предотвращения 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 аттапульгит. 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, поливиниловом 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-гидроксibenзойной кислоты; метил-п-гидроксibenзоат; 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 РМР могут быть добавлены другие компоненты, например, другие гетерологичные функциональные средства, приемлемые с точки зрения сельского хозяйства носители или другие материалы в

соответствии с составами, описанными в данном документе.

Другие необязательные параметры композиции включают добавление носителей или средств для доставки, которые защищают композицию на основе РМР 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.

Для получения дополнительной информации о сельскохозяйственных составах 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. Фармацевтические составы

Описанные в данном документе модифицированные РМР могут быть составлены в фармацевтические композиции, например, для введения животному (например, человеку). Фармацевтическую композицию можно вводить животному (например, человеку) 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 быть в форме единичной дозы.

Композиция на основе РМР может быть составлена, 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 композициях по настоящему изобретению 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 на основе РМР 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 средства и средства для улучшения распадаемости (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, натрий-кроскармеллозу, альгинаты или альгиновую кислоту); связывающие средства (например, сахарозу, глюкозу, сорбит, аравийскую камедь, альгиновую кислоту, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинированный крахмал, микрокристаллическую целлюлозу, алюмосиликат магния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль); а также смазывающие средства, средства, способствующие скольжению, и антиадгезионные средства (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированное растительное масло или тальк). Другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут являться красителями, вкусоароматическими средствами, пластификаторами, увлажнителями, буферными средствами и т. п. Составы для перорального применения также можно получать в единичной лекарственной форме, в виде жевательных таблеток, нежевательных таблеток, капель, 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 на основе РМР 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 среды-носителя. Фармацевтически приемлемые среды-носители включают без ограничения стерильную воду, физиологический раствор или среду для культивирования клеток (например, среду Игла, модифицированную по 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).

II. Гетерологичные функциональные средства

Производимые согласно данному документу РМР могут дополнительно содержать гетерологичное функциональное средство, такое как гетерологичное функциональное средство (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобряющее средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)). Например, РМР может осуществлять инкапсуляцию гетерологичного функционального средства. В качестве альтернативы гетерологичное функциональное средство может быть встроено на поверхность РМР или конъюгировано с ней. В некоторых случаях РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных гетерологичных функциональных средств. Гетерологичные функциональные средства могут быть добавлены на любой стадии процесса производства, эффективной для введения средства в производимые РМР.

В определенных случаях гетерологичное функциональное средство (например, гетерологичное сельскохозяйственное средство (например, пестицидное средство, удобряющее средство, гербицидное средство, средство, модифицирующее растения, гетерологичная нуклеиновая кислота, гетерологичный полипептид или гетерологичная малая молекула) или гетерологичное терапевтическое средство (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых)) могут быть модифицированы. К примеру, модификация может представлять собой химическую модификацию, например конъюгацию с маркером, например флуоресцентным маркером или радиоактивным маркером. В других случаях модификация может включать конъюгацию или функциональную связь с фрагментом, что обеспечивает улучшение стабильности, доставки, целенаправленного воздействия, биологической доступности или периода полужизни средства, например липида, гликана, полимера (например, PEG), катионного фрагмента.

Примеры гетерологичных функциональных средств, которые могут быть загружены в производимые согласно данному документу РМР, приведены ниже.

A. Гетерологичные сельскохозяйственные средства

РМР, производимые согласно данному документу, могут содержать гетерологичное агрономическое средство (например, средство, которое действует на растение или организм, который взаимодействует с растением, и может быть загружено в РМР), такое как пестицидное средство, гербицидное средство, удобряющее средство или

средство, модифицирующее растения.

Например, в некоторых случаях РМР могут содержать пестицидное средство. Пестицидное средство может представлять собой противогрибковое средство, антибактериальное средство, инсектицидное средство, моллюскоцидное средство, нематоцидное средство, вируцидное средство или их комбинацию. Пестицидное средство может представлять собой химическое средство, например хорошо известное в уровне техники. В качестве альтернативы или в качестве дополнения пестицидное средство может представлять собой пептид, полипептид, нуклеиновую кислоту, полинуклеотид или малую молекулу. Пестицидное средство может представлять собой средство, которое может снижать приспособленность различных вредителей растений, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одного или нескольких конкретных целевых вредителей растений (например, конкретный вид или род вредителей растений).

В некоторых случаях РМР могут содержать одно или более гетерологичных удобрений. Примеры гетерологичных удобрений включают питательные вещества для растений или регуляторы роста растений, как, например, такие которые хорошо известны в данной области техники. Альтернативно или дополнительно удобряющее средство может быть пептидом, полипептидом, нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, который может повышать приспособленность симбионта растения. Удобряющее средство может представлять собой средство, которое способно повышать приспособленность различных растений или симбионтов растений, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одно или несколько конкретных целевых растений или симбионтов растений (например, на конкретный вид или род растений или симбионтов растений).

В других случаях РМР могут содержать одно или более гетерологичных средств, модифицирующих растения. В некоторых случаях средство, модифицирующее растения, может включать пептид или нуклеиновую кислоту.

і. Антибактериальные средства

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать антибактериальное средство. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных антибактериальных средств. Например, антибактериальное средство может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) бактерии, являющейся вредителем растения (например, бактериального патогена растений). Композицию на основе РМР, включающую антибиотик, который описан в данном документе, можно привести в контакт с целевым вредителем или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации антибиотика внутри целевого вредителя или на нем и (б) снижения адаптации целевого вредителя. Антибактериальные средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в

композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "антибактериальное 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, бетадин), 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-феноксипропанол и 1- и 2-феноксипропанолы), 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, pH, температуре и токсичности по отношению

к человеку/животному). Среди них важными являются: соответствующе разведенные 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 галеновых препаратах (мази, растворы, пластыри для ран), в прошлом также раствор Люголя, пероксиды в виде растворов пергидрата мочевины и 0,1-0,25% рН-забуференные 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 на основе РМР, описанная в данном документе, может включать антибиотик. Можно применять любой антибиотик, известный в данной области 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.

Другие неограничивающие примеры антибиотиков приведены в таблице 1. Специалисту в данной области техники 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.

Таблица 1. Примеры антибиотиков

Антибиотики	Действие
Пенициллины, цефалоспорины, ванкомицин	Ингибируют синтез клеточной стенки
Полимиксин, грамицидин	Мембраноактивное средство, разрушает клеточную мембрану
Тетрациклины, макролиды, хлорамфеникол, клиндамицин, спектиномицин	Ингибируют синтез белка
Сульфонамиды	Ингибируют фолат-зависимые пути
Ципрофлоксацин	Ингибируют ДНК-гиразу
Изониазид, рифампицин, пипразинамид, этамбутол, (миамбутол), стрептомицин	Антимикобактериальные средства

ii. Противогрибковые средства

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать противогрибковое средство. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных противогрибковых средств. Например, противогрибковое средство может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) гриба, являющегося вредителем растений. Композицию на основе РМР, включающую противогрибковое средство, которое описано в данном документе, можно приводить в контакт с целевым грибом-вредителем или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации антибиотика внутри целевого гриба или на нем и (б) снижения приспособленности целевого гриба. Противогрибковые средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "фунгицид" или "противогрибковое средство" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, деление, размножение или распространение грибов, таких как фитопатогенные грибы.

Множество различных типов противогрибковых средств производится на коммерческой основе. Неограничивающие примеры противогрибковых средств включают: азоксистробин, манкозеп, протиоконазол, фолпет, тебуконазол, дифеноконазол, каптан, бупиримат или фосетил-А1. Дополнительные иллюстративные фунгициды включают без ограничения стробилурины, азоксистробин, димоксистробин, энестробурин, флуоксастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, пикоксистробин, пиракlostробин, трифлуксистробин, оризастробин, карбоксамиды, карбоксанилиды, беналаксил, беналаксил-М, беноданил, карбоксин, мебенил, мепронил, фенфурам, фенгексамид, флутоланил, фуралаксил, фуркарбанил, фураметпир, металаксил, металаксил-М (мефеноксам), метфуроксам, метсульфовакс, офураце, оксадиксил, оксикарбоксин, пентиопирад, пиракарболид, салициланилид, теклофталам, тифлузамид, тиадинил, N-бифениламины, биксафен, боскалид, морфолиды карбоновых кислот, диметоморф, флуморф, бензамиды, флуметовер, флупиколоид (пикобензамид), зоксамид, карбоксамиды, карпропамид, диклоцимет, мандипропамид, силтиофам, азолы, триазолы, битертанол, бромуконазол, ципроконазол, дифеноконазол, диниконазол, энилконазол, эпоксиконазол, фенбуконазол, флузилазол, флухинконазол, флутриафол, гексаконазол, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, пенконазол, пропиконазол, протиоконазол, симеконазол, тебуконазол, тетраконазол, триадименол, триадимефон, тритиконазол, имидазолы, циазофамид, имазалил, пефуразоат, прохлораз, трифлумизол, бензимидазолы, беномил, карбендазим, фуберидазол, тиабендазол, этабоксам, этридиазол, гимексазол, азотсодержащие гетероциклические соединения, пиридины, фуазилам, пирифенокс, пириимидины, бупиримат, ципродинил, феримзон, фенаримол, мепанипирим, нуаримол, пириметанил, пиперазины, трифорин, пирролы, флудиоксонил, фенпиклонил, морфолины, альдиморф, додеморф, фенпропиморф, тридеморф, дикарбоксимиды, ипродион, процимидон, винклозолин, ацибензолар-S-метил, анилазин, каптан, каптафол, дазомет, дикломезин, феноксанил, фолпет, фенпропидин, фамоксадон, фенамидон, октилинон, пробеназол, проквиназид, пироквилон, хиноксифен, трициклазол, карбаматы, дитиокарбаматы, фербам, манкозеп, манеб, метирам, метам, пропинеб, тирам, цинеб, зирам, диетофенкарб, флубентиаваликарб, ипроваликарб, пропамокарб, гуанидины, додин, иминоктадин, гуазатин, касугамицин, полиоксины, стрептомицин, валидамицин А, металлоорганические соединения, соли фентина, серосодержащие гетероциклические соединения, изопротиолан, дитианон, фосфорорганические соединения, эдифосфенфос, фосетил, фосетил-алюминий, ипробенфос, пиразофос, толклофос-метил, хлорорганические соединения, тиофанат-метил, хлороталонил, дихлофлуанид, толилфлуанид, флусульфамид, фталид, гексахлорбензол, пенцикурон, хинтозен, нитрофенильные производные, бинапакрил, динокап, динобутон, спироксамин, цифлуфенамид, цимоксанил, метрафенон, N-2-цианофенил-3,4-дихлоризотиазол-5-карбоксамид (изотианил), N-(3',4',5'-трифторбифенил-2-ил)-3-дифторметил-1-метилпиразол-4-карбоксамид, 3-[5-(4-хлорфенил)-2,3-диметилизоксазолидин-3-ил]пиридин, N-(3',4'-дихлор-4-фторбифенил-2-ил)-3-дифторметил-1-метилпиразол-е-4-

карбоксамид, 5-хлор-7-(4-метилпиперидин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин, 2-бутоксид-6-йод-3-пропилхромен-4-он, N,N-диметил-3-(3-бром-6-фтор-2-метилиндол-1-сульфонил)-[1,2,4]триазол-1-сульфонамид, метил-(2-хлор-5-[1-(3-метилбензилоксиимино)этил]бензил)карбамат, метил-(2-хлор-5-[1-(6-метилпиридин-2-илметокси-имино)этил]бензил)карбамат, метил-3-(4-хлорфенил)-3-(2-изопропоксикарбониламино-3-метилбутириламино)пропионат, 4-фторфенил-N-(1-(1-(4-цианофенил)этансульфонил)бут-2-ил)карбамат, N-(2-(4-[3-(4-хлорфенил)проп-2-инилокси]-3-метоксифенил)этил)-2-метанесульфониламино-3-метилбутирамид, N-(2-(4-[3-(4-хлорфенил)проп-2-инилокси]-3-метоксифенил)этил)-2-этансульфониламино-3-метилбутирамид, N-(4'-бромбифенил-2-ил)-4-дифторметил-2-метилтиазол-5-карбоксамид, N-(4'-трифторметилбифенил-2-ил)-4-дифторметил-2-метилтиазол-5-карбоксамид, N-(4'-хлор-3'-фторбифенил-2-ил)-4-дифторметил-2-метилтиазол-5-карбоксамид или метил-2-(орто-((2,5-диметилфенилоксиметилен)фенил)-3-метоксиакрилат. Специалисту в данной области техники 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.

iii. Инсектициды

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать инсектицид. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных инсектицидных средств. Например, инсектицид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) насекомого, являющегося вредителем растений. Композицию на основе РМР, включающую инсектицид, который описан в данном документе, можно приводить в контакт с целевым насекомым-вредителем или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации инсектицида внутри целевого насекомого или на нем и (б) снижения приспособленности целевого насекомого. Инсектициды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "инсектицид" или "инсектицидное средство" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение насекомых, таких как сельскохозяйственные насекомые-вредители. Неограничивающие примеры инсектицидов приведены в таблице 2. Дополнительные неограничивающие примеры подходящих инсектицидов включают биологические препараты, гормоны или феромоны, такие как азадирахтин, виды *Bacillus*, виды *Beauveria*, кодлемон, виды *Metarrhizium*, виды *Paecilomyces*, *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, флониамид 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 2. 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, хлорэтоксикарб, диметилан, этиофенкарб, фенобукарб, фенотиокарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метам-натрий, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, фосфокарб, пиримикарб, промеккарб, 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, фенитротион, фенсульфотион, фентион, флупиразофос, фонофос, формотион, фосметилан, фостиазат, гептенофос, йодофенфос, ипробенфос, изазофос, изофенфос, изопропил-O-салицилат, изоксатион, малатион, мекарбам,

	<p>метакрифос, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион (-метил/-этил), фентоат, форат, 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, вамидотион</p>
пиретроиды	<p>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)</p>
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, DNOС
МЕТІ	феназахин, фенпироксимат, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон, ацехиноцил, флаукрипирим, 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 флониламид), 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)

iv. Нематоцид

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать нематоцид. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных нематоцидов. Например, нематоцид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) нематоды, являющейся вредителем растений. Композицию на основе РМР, включающую нематоцид, который описан в данном документе, можно привести в контакт с целевой нематодой-вредителем или растением, зараженным им, 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 целевой нематоды. Нематоциды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "нематоцид" или "нематоцидное средство" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение насекомых, таких как сельскохозяйственные нематоды-вредители. Неограничивающие примеры нематоцидов приведены в таблице 3. Специалисту в данной области техники 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 3. 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®

v. Моллюскоцид

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать моллюскоцид. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных моллюскоцидов. Например, моллюскоцид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост

или уничтожать) моллюска, являющегося вредителем растений. Композицию на основе РМР, включающую моллюскоцид, который описан в данном документе, можно приводить в контакт с целевым моллюском-вредителем или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации моллюскоцида внутри целевого моллюска или на нем и (б) снижения приспособленности целевого моллюска. Моллюскоциды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "моллюскоцид" или "моллюскоцидное средство" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение моллюсков, таких как сельскохозяйственные моллюски-вредители. В качестве моллюскоцида можно использовать ряд химических веществ, в том числе соли металлов, такие как фосфат железа (III), сульфат алюминия и EDTA натрия (железа), [3][4], метальдегид, метиокарб или ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Специалисту в данной области будет понятно, что подходящая концентрация каждого моллюскоцида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность моллюскоцида, количество различных моллюскоцидов, состав и способы применения композиции.

vi. Вируциды

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать вируцид. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных вируцидов. Например, вируцид может снижать приспособленность (например, уменьшать или устранять) вирусного патогена растений. Композицию на основе РМР, включающую вируцид, который описан в данном документе, можно привести в контакт с целевым вирусом или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации вируцида и (б) уменьшения или устранения целевого вируса. Вируциды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "вируцид" или "противовирусное средство" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение, развитие или распространение вирусов, таких как сельскохозяйственные вирусные патогены. В качестве вируцида можно использовать ряд средств, в том числе химические или биологические средства (например, нуклеиновые кислоты, например, dsRNA). Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящая концентрация каждого вируцида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность вируцида, количество различных вируцидов, состав и

способы применения композиции.

vii. Гербициды

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных гербицидов. Например, гербицид может снижать приспособленность (например, уменьшать или устранять его) сорняка. Композицию на основе РМР, включающую гербицид, описанный в данном документе, можно приводить в контакт с целевым сорняком в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации гербицида на растении и (б) снижения приспособленности сорняка. Гербициды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР.

Используемый в данном документе термин "гербицид" относится к веществу, которое уничтожает или подавляет рост, пролиферацию, размножение или распространение сорняков. В качестве гербицидов можно использовать ряд химических веществ, в том числе глюфосинат, пропаквизафоп, метамитрон, метазахлор, пендиметалин, флуфенацет, дифлуфеникан, кломазон, никосульфурон, мезотрион, пиноксаден, сулькотрион, просульфокарб, сульфентразон, бифенокс, хинмерак, триаллат, тербутилазин, атразин, оксифлуорфен, диурон, трифлуралин или хлоротолурон. Дополнительные примеры гербицидов включают без ограничения гербициды на основе бензойной кислоты, такие как сложные эфиры дикамбы, гербициды на основе феноксиалкановой кислоты, такие как сложные эфиры 2,4-D, МСРА и 2,4-DB, гербициды на основе арилоксифеноксипропионовой кислоты, такие как сложные эфиры клодинафопа, цихалофопа, феноксапропа, флуазифопа, галоксифопа и хизалофопа, гербициды на основе пиридинкарбоновой кислоты, такие как сложные эфиры аминоклопирахлора, гербициды на основе пиридинкарбоновой кислоты, такие как сложные эфиры аминоклопирахлора, гербициды на основе пиридилоксиалкановой кислоты, такие как сложные эфиры фтороксипира и триклопира, и гербициды на основе гидроксibenзонитрила, такие как сложные эфиры бромоксинила и иоксинила, сложные эфиры арилпиридинкарбоновых кислот и арилпиримидинкарбоновые кислоты с общими структурами, описанными в патенте США № 7314849, патенте США № 7300907 и патенте США № 7642220, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В определенных вариантах осуществления гербицид может быть выбран из группы, состоящей из 2,4-D, 2,4-DB, ацетохлора, ацифлуорфена, алахлора, аметрина, амитрола, асулама, атразина, азафенидина, бенефина, бенсульфурана, бенсулида, бентазона, бромацила, бромоксинила, бутилата, карфентразона, хлорамбена, хлоримурана, хлорпроама, хлорсульфурана, клетодима, кломазона, клопиралаида, клорансулама, цианазина, циклоата, ДСРА, десмедифама, дихлобенила, диклофопа, диклосулама, дизатила, дифензоквата, дифлуфензопира,

диметенамида-п, диквата, диурана, DSMA, эндоталла, ЕРТС, эталфлуралина, этаметсульфурана, этофумесата, феноксапропа, флуазифопа-Р, флукарбазона, флуфенацета, флуметсулама, флумиклорака, флумиоксазина, флуометурона, флуороксипира, флутиацета, фомесафена, форамсульфурана, глюфосината, глифосата, галосульфурана, галоксифопа, гексазинона, имазаметабактофенза, имазамокса, имазапика, имазахина, имазетапира, изоксабена, изоксафлутола, лактофена, линурана, МСРА, МСРВ, мезотриона, метазола, метолахлора-s, метрибузина, метсульфурана, молината, MSMA, напропамида, напталама, никосульфурана, норфлуразона, оризалина, оксадиазона, оксасульфурана, оксифлуорфена, параквата, пебулата, пеларгоновой кислоты, пендиметалина, фенмедифама, пиклорама, примисульфурана, продиамина, прометрина, пронамида, пропахлора, пропанила, просульфурана, пиразона, пиридата, пиритиобака, хинклорака, хизалофопа, римсульфурана, сетоксидима, сидурана, симазина, сульфентразона, сульфометурона, сульфосульфурана, тебутиурана, тербацила, тиазопира, тифенсульфурана, тиобенкарба, тралкоксидима, триаллата, триасульфурана, трибенурана, триклопира, трифлуралина, трифлусульфурана, вернолата. Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящая концентрация каждого гербицида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность гербицида, количество различных гербицидов, состав и способы применения композиции.

viii. Репелленты

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать репеллент. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных репеллентов. Например, репеллент может отпугивать любого из вредителей, описанных в данном документе (например, насекомых, нематод или моллюсков); микроорганизмы (например, фитопатогены или эндофиты, такие как бактерии, грибы или вирусы) или сорняки. Композицию на основе РМР, включающую репеллент, который описан в данном документе, можно приводить в контакт с целевым растением или растением, зараженным им, в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации репеллента и (b) снижения уровней вредителя на растении по сравнению с необработанным растением. Репеллент, описанный в данном документе, может быть составлен в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях может быть ассоциирован с их РМР.

В некоторых случаях репеллент представляет собой репеллент от насекомых. Некоторые примеры хорошо известных репеллентов от насекомых включают бензил; бензилбензоат; 2,3,4,5-бис(бутил-2-ен)тетрагидрофурфурол (репеллент 11 МКГ); бутоксиполипропиленгликоль; N-бутилацетанилид; нормальный-бутил-6,6-диметил-5,6-дигидро-1,4-пирон-2-карбоксилат (индалон); дибутиладипат; дибутилфталат; ди-нормальный-бутилсукцинат (табатрекс); N,N-диэтилметатолауамид (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).

Репеллент от насекомых может представлять собой синтетический или несинтетический репеллент. 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, Waugerel 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 простой трициклодеценилаллиловый эфир. Примеры природных репеллентов от насекомых включают листья красивоплодники (*Callicarpa*), кору березы, болотный мирт (*Myrca 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.

ix. Удобряющие средства

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать удобряющее средство. В некоторых случаях гетерологичное удобряющее средство ассоциировано с РМР. Например, РМР может инкапсулировать гетерологичное удобряющее средство. Дополнительно или в качестве альтернативы гетерологичное удобряющее средство может быть встроено на поверхность РМР или конъюгировано с ней.

Примеры гетерологичных удобрений включают питательные вещества для растений или регуляторы роста растений, как, например, такие которые хорошо известны в данной области техники. Альтернативно или дополнительно удобряющее средство может быть пептидом, полипептидом, нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, который может повышать приспособленность симбионта растения. Удобряющее средство может представлять собой средство, которое способно повышать приспособленность различных растений или симбионтов растений, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одно или несколько конкретных целевых растений или симбионтов растений (например, на конкретный вид или род растений или симбионтов растений).

В некоторых случаях гетерологичное удобряющее 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

конъюгацию или функциональную связь с фрагментом, что обеспечивает улучшение стабильности, доставки, целенаправленного воздействия, биологической доступности или периода полужизни средства, например липида, гликана, полимера (например, PEG), катионного фрагмента.

Примеры гетерологичных удобряющих средств, которые можно использовать в раскрытых в данном документе композициях на основе РМР и способах, приведены ниже.

В некоторых случаях гетерологичное удобряющее средство включает любой материал природного или синтетического происхождения, который наносят на почву или ткани растений для доставки одного или нескольких питательных веществ для растений, необходимых для роста растений. Питательное вещество для растений может включать макроэлемент, микроэлемент или их комбинацию. Макроэлементы для растений включают азот, фосфор, калий, кальций, магний и/или серу. Микроэлементы для растений включают медь, железо, марганец, молибден, цинк, бор, кремний, кобальт и/или ванадий. Примеры удобрений, содержащих питательные вещества для растений, включают азотные удобрения, в том числе без ограничения мочевины, нитрат аммония, сульфат аммония, аммиакаты без давления, аммиачную воду, безводный аммиак, тиосульфат аммония, покрытую серой мочевины, карбамидоформальдегиды, IBDU, мочевины с полимерным покрытием, нитрат кальция, уреаформ или метиленмочевины, фосфорные удобрения, такие как диаммонийфосфат, моноаммонийфосфат, полифосфат аммония, концентрированный суперфосфат и тройной суперфосфат, или калийные удобрения, такие как хлорид калия, сульфат калия, сульфат калия-магния, нитрат калия. Такие композиции могут существовать в виде свободных солей или ионов в составе композиции. Удобрения могут быть обозначены по содержанию одного или нескольких его компонентов, таких как азот, фосфор или калий. Содержание данных элементов в удобрении может быть указано значением N-P-K (где N=содержание азота в процентах по весу, P=содержание фосфора в процентах по весу и K=содержание калия в процентах по весу).

Неорганические удобрения, с другой стороны, производятся из неживых материалов и включают, например, нитрат аммония, сульфат аммония, мочевины, хлорид калия, поташ, фосфат аммония, безводный аммиак и другие фосфатные соли. Неорганические удобрения легко доступны для приобретения и содержат питательные вещества в растворимой форме, которые немедленно становятся доступными для растений. Неорганические удобрения обычно недороги и имеют низкую себестоимость единицы требуемого элемента. Специалист в данной области техники поймет, что точное количество заданного элемента в удобряющем средстве можно рассчитать и ввести в растение или почву.

Удобрения можно также классифицировать как органические удобрения или неорганические удобрения. Органические удобрения включают удобрения, имеющие молекулярный скелет с углеродной основой, например, в композициях, полученных из живого вещества. Органические удобрения производят из материалов, полученных от живых существ. Навоз, компост, костная мука, перьевая мука и кровяная мука являются

примерами обычных органических удобрений. С другой стороны, органические удобрения, как правило, не сразу доступны растениям и требуют, чтобы почвенные микроорганизмы расщепили компоненты удобрений на более простые структуры перед использованием растениями. Кроме того, органические удобрения могут не только инициировать рост растений, как это наблюдается с обычными неорганическими удобрениями, но природные органические удобрения могут также стимулировать рост и активность микробной популяции почвы. Увеличение микробной популяции почвы (например, симбионтов растений) может оказывать значительное благотворное влияние на физические и химические свойства почвы, а также на повышение устойчивости к болезням и вредителям.

В одном аспекте композицию на основе РМР, включающую питательное вещество для растений, описанное в данном документе, можно приводить в контакт с растением в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации питательных веществ для растений внутри или на растении и (б) повышения приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте композицию на основе РМР, включающую питательное вещество для растений, описанное в данном документе, можно привести в контакт с симбионтом растения в количестве и в течение времени, достаточных для: а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации питательных веществ для растений внутри или на симбионте растения (например, бактериальном или грибковом эндосимбионте) и (б) повышения приспособленности симбионта растения по сравнению с необработанным симбионтом растения.

Гетерологичное удобряющее средство может включать регулятор роста растений. Иллюстративные регуляторы роста растений включают ауксины, цитокинины, гиббереллины и абсцизовую кислоту. В некоторых случаях регулятором роста растений является абсцизовая кислота, амидохлор, анцимидол, 6-бензиламинопурин, брассинолид, бутралин, хлормекват (хлорид хлормеквата), хлорид холина, цикланилид, даминозид, дикегулак, диметипин, 2,6-диметилпуридин, этифон, флуметралин, флурпримидол, флутиацет, форхлорфенурон, гибберелловая кислота, инабенфид, индол-3-уксусная кислота, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, мепикват (хлорид мепиквата), нафталиноуксусная кислота, N-6-бензиладенин, паклобутразол, прогексадион (прогексадион-кальций), прогидрожасмон, тидиазурон, триапентенон, трибутилфосфотритиоат, 2,3,5-трийодбензойная кислота, тринексапак-этил и униконазол. Другие регуляторы роста растений, которые могут быть включены в композиции для покрытия семян, описаны в US 2012/0108431, которая полностью включена посредством ссылки.

х. Средства, модифицирующие растения

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, содержат одно или более гетерологичных средств, модифицирующих растения. Например, РМР могут

инкапсулировать гетерологичное средство, модифицирующее растения. В качестве альтернативы или дополнительно гетерологичное средство, модифицирующее растения, может быть встроено на поверхность РМР или конъюгировано с ней.

В некоторых случаях средство, модифицирующее растения, может включать пептид или нуклеиновую кислоту. Средство, модифицирующее растения, может представлять собой средство, которое повышает приспособленность различных растений, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одно или несколько конкретных растений (например, конкретный вид или род растений). Дополнительно в некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных средств, модифицирующих растения.

Дополнительно в некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения (например, средство, включающее молекулу нуклеиновой кислоты или пептид), 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 конъюгацию или функциональную связь с фрагментом, что обеспечивает улучшение стабильности, доставки, целенаправленного воздействия, биологической доступности или периода полужизни средства, например липида, гликана, полимера (например, PEG), катионного фрагмента.

Примеры гетерологичных средств, модифицирующих растения (например, пептиды или нуклеиновые кислоты), которые можно использовать в раскрытых в данном документе композициях на основе РМР и способах, приведены ниже.

А. Полипептиды

Композиция на основе РМР (например, РМР), описанная в данном документе, может содержать гетерологичный полипептид. В некоторых случаях композиция на основе РМР, описанная в данном документе, содержит полипептид или его функциональные фрагменты или производные, которые модифицируют растение (например, повышают приспособленность растения). Например, полипептид может повышать приспособленность растения. Композицию на основе РМР, включающую полипептид, описанный в данном документе, можно приводить в контакт с растением в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации полипептида и (б) модификации растения (например, повышения приспособленности растения).

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), рибопротейн, белковый аптамер или шаперон.

Полипептиды, включенные в данный документ, могут включать 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 вариантов применения, описанных в данном документе. Композиции, раскрытые в данном документе, могут включать 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 можно получать с использованием 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 Kantardjieff (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 на основе РМР содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, средство, описанное в данном документе, может представлять собой антитело, которое блокирует или усиливает активность и/или функцию компонента растения. Антитело может выступать в растении в качестве антагониста или агониста полипептида (например, фермента или клеточного рецептора). Получение и применение антител к целевому антигену 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.

В. Нуклеиновые кислоты

В некоторых случаях РМР, описанные в данном документе, содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту. Многочисленные нуклеиновые кислоты являются применимыми в композициях на основе РМР и способах, описанных в данном документе. РМР, раскрытые в данном документе, могут включать любое число или тип (например, классы) гетерологичных 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.

Композицию на основе РМР, включающую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, можно приводить в контакт с растением в количестве и в течение времени, достаточных для: (а) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации нуклеиновой кислоты и (b) модификации растения (например, повышения приспособленности растения).

(а) Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид

В некоторых случаях РМР содержат гетерологичную 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 на основе РМР 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.

Определенные 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 1α (EF- 1α). Однако также можно использовать другие последовательности конститутивных промоторов, в том числе 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 на основе РМР 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 на основе IVT известны из уровня 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 со 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 (в том числе простые сахара), катионные липиды, фибриновый гель, фибриновый гидрогель, фибриновый клей, фибриновый герметик, фибриноген, тромбин, быстро элиминируемые липидные наночастицы (teLNP)) 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 на основе РМР содержит молекулу ингибирующей РНК, например, которая действует посредством пути РНК-интерференции (RNAi). В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень экспрессии гена у растения и/или снижает уровень белка у растения. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК подавляет экспрессию гена растения. Например, молекула ингибирующей РНК может содержать короткую интерферирующую РНК, короткую шпилечную РНК и/или microRNA, которая целенаправленно воздействует на ген у растения. Определенные молекулы РНК могут подавлять экспрессию генов путем биологического процесса РНК-интерференции (RNAi). Молекулы для RNAi включают РНК или РНК-подобные структуры, как правило, содержащие 15-50 пар оснований (например, приблизительно 18-25 пар оснований) и имеющие последовательность нуклеиновых оснований, идентичную (комплементарную) или почти идентичную (по сути комплементарную) кодирующей последовательности в экспрессируемом гене-мишени в клетке. Молекулы для RNAi включают без ограничения короткие интерферирующие РНК (siRNA), двухнитевые РНК (dsRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA), меродуплексы, субстраты для дайсер и мультивалентные интерферирующие РНК (патенты США №№ 8084599, 8349809, 8513207 и 9200276). shRNA представляет собой молекулу РНК, содержащую шпилечный оборот, которая обеспечивает снижение экспрессии генов-мишеней путем 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 генов у растения. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой mRNA, модифицированную mRNA или молекулу ДНК, которая повышает экспрессию фермента в растении (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 "цинковые пальцы"), 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 растения представляет собой повышение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией у необработанного растения). В некоторых случаях повышение экспрессии у растения 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 референтным уровнем (например, экспрессией у необработанного растения).

В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, dsRNA, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолиновую нуклеиновую кислоту, LNA, piRNA, рибозим, ДНКзим, аптамер (ДНК, РНК), circRNA, gRNA или молекулу ДНК (например, антисмысловой полинуклеотид), которая действует посредством снижения экспрессии у растения, например, фермента (метаболического фермента, фермента,

представляющего собой рекомбиназу, фермента, представляющего собой хеликазу, фермента, представляющего собой интегразу, фермента, представляющего собой РНКазу, фермента, представляющего собой ДНКазу, фермента, представляющего собой полимеразу, белка, вовлеченного в убиквитинирование, фермента, осуществляющего контроль содержания супероксида, или фермента, отвечающего за синтез 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 растения представляет собой снижение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией у необработанного растения). В некоторых случаях снижение экспрессии у растения 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 референтным уровнем (например, экспрессией у необработанного растения).

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 гибридизоваться 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 более 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 эндогенной microRNA (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'-дезоксидезоксиуридина. 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.

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 на основе РМР, описанные в данном документе, могут содержать компонент системы редактирования генов. Например, средство может вносить изменение (например, вставку, делецию (например, нокаут), транслокацию, инверсию, точечную мутацию или другую мутацию) в ген растения. 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, прилежащему 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: 1) (*Streptococcus pyogenes*), 5'-NNAGAA (SEQ ID NO: 2) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR1), 5'-NGGNG (SEQ ID NO: 3) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR3) и 5'-NNGATT (SEQ ID NO: 4) (*Neisseria meningitidis*). Некоторые эндонуклеазы, например эндонуклеазы Cas9, ассоциированы с сайтами PAM с высоким содержанием G, например 5'-NGG (SEQ ID NO: 1), и они осуществляют расщепление с образованием тупых концов целевой ДНК в положении на 3 нуклеотида выше от (от 5') сайта PAM. Другая система CRISPR II класса включает 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 T, например, 5'-TTN (SEQ ID NO: 5). Cpf1 также может распознавать PAM-мотив 5'-СТА (SEQ ID NO: 6). 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., к примеру, 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 никаза 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 одонитевые 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 одонитевой 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 одонитевой ДНК, то коровая последовательность фланкируется гомологичными плечами, содержащими 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 двухнитевой ДНК, то коровая последовательность фланкируется гомологичными плечами, содержащими 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 двухнитевых разрыва вводят в клетку или целевую нуклеотидную последовательность субъекта с помощью двойной нуклеазы Cas9 (см. Ran et al., Cell 154:1380-1389, 2013) с последующей доставкой донорной матрицы.

В некоторых случаях композиция содержит gRNA и нацеленную нуклеазу, например, Cas9, например, Cas9 дикого типа, нуклеазу 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 растения. В некоторых случаях средство включает TALEN или mRNA, кодирующую TALEN, которая целенаправленно воздействует на (например, расщепляет) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) в гене растения.

Например, gRNA можно использовать в системе CRISPR для конструирования изменения гена у растения. В других примерах ZFN и/или TALEN можно использовать для конструирования изменения гена у растения. 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 растения. В других примерах изменение снижает уровень и/или активность (например, приводит к нокдауну или нокауту) гена у растения. В еще одном примере изменение исправляет дефект (например, мутацию, вызывающую дефект) в гене у растения.

В некоторых случаях система CRISPR используется для редактирования (например, для добавления или удаления пары оснований) гена-мишени у растения. 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 растения 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 растения. 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 реессию генов.

В некоторых случаях активация гена, опосредованная CRISPR (CRISPRa), может использоваться для активации транскрипции гена у растения. 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 растения. 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. К примеру, 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 растения могут использоваться опосредованные dCas9 эпигенетические модификации и одновременная активация и репрессия с использованием систем CRISPR, как описано у Dominguez et al.

В. Гетерологичные терапевтические средства

PMP, производимые в данном документе, могут содержать гетерологичное терапевтическое средство (например, средство, которое воздействует на животное (например, млекопитающее, например, человека), патоген животного или его переносчик патогена, и может быть загружено в PMP), такое как терапевтический пептид, терапевтическая нуклеиновая кислота (например, терапевтическая РНК), терапевтическая малая молекула или средство для контроля патогенов (например, противогрибковое средство, антибактериальное средство, вируцидное средство, противовирусное средство,

инсектицидное средство, нематоцидное средство, противопаразитарное средство или репеллент от насекомых). РМР, загруженные такими средствами, могут быть составлены с фармацевтически приемлемым носителем для доставки по отношению к животному, патогену животного или его переносчику патогена.

і. Антибактериальные средства

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать антибактериальное средство. Например, описанную в данном документе композицию на основе РМР, 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. Антибактериальные средства, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных антибактериальных средств.

Используемый в данном документе термин "антибактериальное 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: соответствующе разведенные 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 галеновых препаратах (мази, растворы, пластыри для ран), в прошлом также раствор Люголя, пероксиды в виде растворов пергидрата мочевины и 0,1-0,25% рН-забуференные 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 на основе РМР, описанная в данном документе, может включать антибиотик. Можно применять любой антибиотик, известный в данной области 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.

Примеры антибактериальных средств, подходящих 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 (cephacettrile), 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, цефпарол, 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), стрептограминны (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, энноксацин, 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 (липопептиды, фторхинолон, липогликопептиды, цефалоспорин, макроциклические антибиотики, 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 техники 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.

ii. Противогрибковые средства

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать противогрибковое средство. Например, композицию на основе РМР, 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 на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 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. Множество 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 (толнафат, флуцитозин, бутенафин, гризеофульвин, циклопирокс, сульфид селена, таваборол). Специалисту в данной области техники 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.

iii. Инсектициды

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать инсектицид. Например, инсектицид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) насекомого, являющегося переносчиком патогена животного. Композицию на основе РМР, включающую инсектицид, описанный в данном документе, можно приводить 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) насекомого-паразита. Композиция на основе РМР, включающая описанный в данном документе инсектицид, может быть приведена в контакт с насекомым-паразитом 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 насекомого-паразита или на нем и (б) снижения приспособленности насекомого-паразита. Инсектициды, описанные в данном документе, могут быть составлены в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиции на основе РМР включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 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 патогенов животных или насекомые-паразиты. Неограничивающие примеры инсектицидов приведены в таблице 4. 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 4. 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, хлоэтокарб, диметилан, этиофенкарб, фенобукарб, фенотиокарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метам-натрий, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, фосфокарб, пиримикарб, промеккарб, 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, фенитротион, 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, форат, 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, вамидотион
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	индоксакарб, 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, эмамектин, эмамектин-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, DNOC
МЕТІ	феназахин, фенпироксимат, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон, ацехиноцил, флакрипирим, 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)

iv. Нематоциды

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать нематоцид. В некоторых случаях композиция на основе РМР включает два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных нематоцидов. Например,

нематоцид может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) паразитической нематоды. Композиция на основе РМР, включающая описанный в данном документе нематоцид, может быть приведена в контакт с паразитической нематодой или с пораженным ею 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 на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а 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 5. Специалисту в данной области техники 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 5. 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 [®]

v. Противопаразитарное средство

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать противопаразитарное средство. Например, противопаразитарное средство может снижать приспособленность (например, уменьшать рост или уничтожать) паразитических простейших. Композиция на основе РМР, 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 полезным в лечении или предупреждении заражения паразитами у животных. Например, композицию

на основе РМР, 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 для лечения или предупреждения инвазии паразитами животного (например, паразитической нематодой, насекомым-паразитом или простейшим). Противопаразитарное средство, описанное в данном документе, может быть составлено в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, а в определенных случаях может быть ассоциировано с их РМР. В некоторых случаях композиция на основе РМР включает два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных противопаразитарных средства.

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 насекомые-паразиты. 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), противоцестодозные средства (никлозамид, пранзиквантел, 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 домашнего скота, например, левамизол, фенбендазол, оксфендазол, альбендазол, моксидектин, эприномектин, дорамектин, ивермектин или хлорсулон. Специалисту в данной области техники 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.

vi. Противовирусное средство

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать противовирусное средство. Композицию на основе РМР, 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 на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях могут быть ассоциированы с их РМР. В некоторых случаях композиция на основе РМР включает два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 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, маравирок, 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), теллапревир, тенофовир, тенофовир дизопроксил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валакцикловир (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.

vii. Репелленты

Композиции на основе РМР, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать репеллент. Например, репеллент может отпугивать переносчиков патогенов животных, таких как насекомые. Репеллент, описанный в данном документе, может быть составлен в композицию на основе РМР для любого из способов, описанных в данном документе, и в определенных случаях может быть ассоциирован с их РМР. В некоторых случаях композиция на основе РМР включает два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных репеллентов.

Например, композиция на основе РМР, включающая 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 рядом с ближайшим животным или на них по сравнению с контролем. В качестве альтернативы композиция на основе РМР, включающая описанный в данном документе репеллент, может быть приведена в контакт с животным в количестве и в течение времени, достаточных для: (a) 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)тетрагидрофурфурол (репеллент 11 MGK); бутоксиполипропиленгликоль; N-бутилацетанилид; нормальный-бутил-6,6-диметил-5,6-дигидро-1,4-пирон-2-карбоксилат (индалон); дибутиладипат; дибутилфталат; ди-нормальный-бутилсукцинат (табатрекс); N,N-диэтилметатолауамид (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 от 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, Ваугерел 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 простой трициклодеценилаллиловый эфир. Примеры природных репеллентов от насекомых включают листья красивоплодники (*Callicarpa*), кору березы, болотный мирт (*Mugica 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.

III. Способы применения

РМР, представленные в данном документе, можно использовать в различных сельскохозяйственных или терапевтических способах. Примеры способов применения РМР (например, включая модифицированные РМР, описанные в данном документе) описаны ниже.

А. Доставка по отношению к растению

В данном документе представлены способы доставки композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) по отношению к растению, например, путем приведения растения или его части в контакт с композицией на основе РМР. В некоторых случаях растения могут быть обработаны посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство. В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, пестицидные средства (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства, нематоциды, моллюскоциды, вируциды, гербициды), средства для контроля вредителей (например, репелленты), удобрения или средства, модифицирующие растения.

В одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, где способ включает доставку по отношению к растению композиции на основе РМР, описанной в данном документе (например, в эффективном количестве и в течение эффективного периода времени), для повышения приспособленности растения по сравнению с необработанным растением (например, растением, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции на основе РМР).

Повышение приспособленности растения вследствие доставки композиции на основе РМР может проявляться несколькими путями, например, приводя таким образом к более высокой производительности растения, например, повышенной урожайности, повышенной жизнеспособности растения или повышению качества продукта, собранного с растения. Повышение урожайности растения относится к повышению урожайности продукта (например, определяемого по биомассе растения, урожаю зерна, семян или плодов, содержанию белка, углеводов или масел или площади листьев) растения на измеримое количество по сравнению с урожайностью того же продукта растения, полученного в тех же условиях, но без применения композиций по настоящему изобретению или по сравнению с применением обычных сельскохозяйственных средств. Например, урожайность может быть повышена на по меньшей мере приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% или более 100%. Урожайность может быть выражена в количестве по массе или объему растения или продукта растения на некоторой основе. Основа может быть выражена с учетом времени, площади выращивания, веса выращенных растений или количества используемого сырья. Например, такие способы могут приводить к повышению урожайности растительных тканей, в том числе без ограничения семян, плодов, ядер, семенных коробочек, клубней, корней и листьев.

Повышение жизнеспособности растения как следствие доставки композиции на основе РМР также можно измерить посредством других способов, таких как увеличение

или улучшение показателя жизнеспособности, насаждения (количества растений на единицу площади), высота растения, окружность стебля, длина стебля, количество листьев, размер листа, ярус листового полога, внешний вид (например, более зеленый цвет листьев), оценка корней, всхожесть, содержание белка, повышенное кущение, более крупные листья, большее количество листьев, меньшее количество мертвых прикорневых листьев, более сильные побеги, потребность в меньшем количестве удобрений, потребность в меньшем количестве семян, более продуктивные побеги, более раннее цветение, раннее зерно или зрелость семян, меньшая ломкость растений (полегание), усиленный рост побегов, более раннее прорастание или любая комбинация этих факторов на измеримую или значительную величину по сравнению с тем же фактором растения, выращенного в тех же условиях, но без введения композиций по настоящему изобретению или с применением обычных пестицидов.

В данном документе представлен способ модификации или повышения приспособленности растения, при этом способ включает доставку по отношению к растению эффективного количества композиции на основе РМР, представленной в данном документе, где способ обеспечивает модификацию растения и тем самым вводится или усиливается полезный признак в растении (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением. В частности, способ может обеспечивать повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В некоторых случаях повышение приспособленности растений представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) устойчивости к болезням, засухоустойчивости, устойчивости к жаре, устойчивости к холоду, солеустойчивости, устойчивости к металлам, устойчивости к гербицидам, устойчивости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, фиксации азота, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетической способности, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корня, структуры корня, веса семян или количества собираемого урожая.

В некоторых случаях повышение приспособленности представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) развития, роста, урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам. Абиотический стресс относится к состоянию стресса окружающей среды, которому подвергается растение или часть растения, которое включает, например, стресс

засухи, солевой стресс, тепловой стресс, холодовой стресс и стресс низкого содержания питательных веществ. Биотический стресс относится к состоянию стресса окружающей среды, которому подвергается растение или часть растения, которое включает, например, стресс, вызываемый нематодами, стресс, вызываемый травоядными насекомыми, стресс, вызываемый грибковыми патогенами, стресс, вызываемый бактериальными патогенами, или стресс, вызываемый вирусными патогенами. Стресс может быть временным, например несколько часов, несколько дней, несколько месяцев, или постоянным, например, в течение жизни растения.

В некоторых случаях повышение приспособленности растения представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) качества продуктов, собираемых с растения. Например, повышение приспособленности растения может быть улучшением коммерчески благоприятных характеристик (например, вкуса или внешнего вида) продукта, собранного с растения. В других случаях повышение приспособленности растения представляет собой повышение срока хранения продукта, собранного с растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%).

В качестве альтернативы повышение приспособленности может представлять собой изменение характеристики, которая полезна для здоровья человека или животных, например, снижение синтеза аллергена. Например, повышение приспособленности может представлять собой снижение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) синтеза аллергена (например, пыльцы), который стимулирует иммунный ответ у животного (например, человека).

Модификация растения (например, повышение приспособленности) может возникать в результате модификации одной или нескольких частей растения. Например, растение можно модифицировать посредством контакта с листом, семенем, пыльцой, корнем, плодом, побегом, цветком, клетками, протопластами или тканью (например, меристематической тканью) растения. По сути, в другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение пыльцы растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение семени растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, раскрытой в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ, включающий приведение протопласта растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В дополнительном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение клетки растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение меристематической ткани растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение зародыша растения в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В тех случаях, когда гербицид включен в РМР или композиции на его основе, способы могут дополнительно применяться для снижения приспособленности или уничтожения сорняков. В таких случаях способ может быть эффективным для снижения приспособленности сорняка на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком (например, сорняком, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР). Например, способ может быть эффективным для уничтожения сорняков, уменьшая тем самым популяцию сорняков на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком. В некоторых случаях этот способ в значительной степени устраняет сорняк. Примеры сорняков, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, описаны ниже.

i. Растения

По отношению к различным растениям можно доставлять композицию на основе РМР, описанную в данном документе, или обрабатывать их ею. Растения, по отношению к которым может быть доставлена композиция на основе РМР (т.е., которые могут быть

"обработанными") в соответствии со способами по настоящему изобретению включают целые растения и их части, в том числе без ограничения органы/структуры вегетативных побегов (например, листья, стебли и клубни), корни, цветки и органы/структуры цветков (например, прицветники, чашелистики, лепестки, тычинки, плодолистики, пыльники и семяпочки), семена (в том числе зародыш, эндосперм, семядоли и оболочку семян) и плоды (зрелую завязь), растительную ткань (например, сосудистую ткань, основную паренхиму и т. п.) и клетки (например, замыкающие клетки, яйцеклетки и т. п.) и их потомство. Части растения могут также относиться к частям растения, таким как побег, корень, стебель, семена, прилистники, листья, лепестки, цветки, семяпочки, прицветники, ветви, черешки, междоузлия, кора, опушение, побеги, корневища, вайи, пластинки, пыльца, тычинки и т. п.

Класс растений, которые можно обрабатывать способом, описанным в данном документе, включает класс высших и низших растений, в том числе покрытосеменные (однодольные и двудольные), голосеменные, папоротники, хвощи, псилофиты, ликофиты, мохообразные и водоросли (например, многоклеточные или одноклеточные водоросли). Растения, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, дополнительно включают любые сосудистые растения, например, однодольные, двудольные или голосеменные, в том числе без ограничения люцерну, яблоню, растение рода *Arabidopsis*, банан, ячмень, канолу, клещевину, цикорий, хризантему, клевер, какао, кофе, хлопчатник, семена хлопчатника, кукурузу, крамбе, клюкву, крестоцветные, огурец, дендробиум, диоскорею, эвкалипт, овсяницу, лен, гладиолус, лилейное, семена льна, просо, дыню, горчицу, овес, масличную пальму, масличный рапс, папайю, арахис, ананас, декоративные растения, фасоль, картофель, рапс, рис, рожь, райграс, сафлор, кунжут, сорго, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, подсолнечник, клубнику, табак, томат, газонную траву, пшеницу и овощные культуры, такие как салат, сельдерей, брокколи, цветная капуста, тыквенные культуры; фруктовые и ореховые деревья, такие как яблоня, груша, персик, апельсин, грейпфрут, лимон, лайм, миндаль, пекан, грецкий орех, лещина; вьющиеся растения, такие как виноград (например, виноградник), киви, хмель; плодовые кустарники и колючие кустарники, такие как малина, ежевика, крыжовник; лесные деревья, такие 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. Растения, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают любую сельскохозяйственную культуру, например, кормовую культуру, масличную культуру, зерновую культуру, плодовую культуру, овощную культуру, волокнистую культуру, пряную культуру, ореховую культуру, газонную культуру, сахарную культуру, культуру для производства напитков и лесную культуру. В определенных случаях сельскохозяйственная культура, которую обрабатывают в соответствии с этим способом,

представляет собой растение сои. В других определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой пшеницу. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой кукурузу. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой хлопчатник. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой люцерну. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой сахарную свеклу. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой рис. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой томат. В определенных случаях сельскохозяйственная культура представляет собой картофель.

В определенных случаях растение представляет собой культуру. Примеры таких сельскохозяйственных культур включают без ограничения однодольные и двудольные растения, включая, в частности, кормовые или кормовые бобовые, декоративные растения, пищевые культуры, деревья или кустарники, выбранные *Acer* spp., *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ananas comosus*, *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Asparagus officinalis*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, из *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. (канолы, масличного рапса, капусты полевой), *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Castanea* spp., *Cichorium endivia*, *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Daucus carota*, *Fagus* spp., *Ficus carica*, *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например, *Helianthus annuus*), *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Lycopersicon* spp. (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Malus* spp., *Medicago sativa*, *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Petroselinum crispum*, *Phaseolus* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prunus* spp., *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* spp., *Solanum* spp. (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Spinacia* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* или *Triticum vulgare*), *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., и *Zea mays*. В определенных вариантах осуществления сельскохозяйственная культура представляет собой рис, масличный рапс, рапс, сою, кукурузу (маис), хлопчатник, сахарный тростник, люцерну, сорго или пшеницу.

В определенном случае композиции и способы можно применять для обработки растений или частей растений, пищевых продуктов или кормовых продуктов после сбора урожая. В некоторых случаях пищевой или кормовой продукт представляет собой

нерастительный пищевой или кормовой продукт (например, продукт, съедобный для людей, ветеринарных животных или домашнего скота (например, грибы)).

Растение или часть растения для применения в настоящем изобретении включают растения на любой стадии развития растения. В определенных случаях доставка может происходить на стадиях прорастания, роста проростков, вегетативного роста и репродуктивного роста. В определенных случаях доставка растению происходит на стадиях вегетативного и репродуктивного роста. В качестве альтернативы доставка может происходить в семя. Стадии вегетативного и репродуктивного роста также называются в данном документе как "взрослые" или "зрелые" растения.

ii. Сорняки

В тех случаях, когда гербицид включен в РМР или композиции на его основе, способы могут дополнительно применяться для снижения приспособленности или уничтожения сорняков. В таких случаях способ может быть эффективным для снижения приспособленности сорняка на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком (например, сорняком, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР). Например, способ может быть эффективным для уничтожения сорняков, уменьшая тем самым популяцию сорняков на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком. В некоторых случаях этот способ в значительной степени устраняет сорняк. Примеры сорняков, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, описаны ниже.

Используемый в данном документе термин "сорняк" относится к растению, которое произрастает в том месте, где это нежелательно. Такие растения, обычно, инвазивные, а иногда вредны, или характеризуются возможностью стать таковыми. Сорняки можно обрабатывать композициями на основе РМР по настоящему изобретению для снижения или устранения присутствия, жизнеспособности или воспроизведения растения. Например, и без ограничения, способы можно применять для целенаправленного воздействия на сорняки, которые, как известно, повреждают растения. Например, и без ограничения, сорняки могут представлять собой любого представителя из следующей группы семейств: Gramineae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae, Malvaceae, Eufhorbiaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Fumariaceae, Charyophyllaceae, Primulaceae, Geraniaceae, Polygonaceae, Juncaceae, Cyperaceae, Aizoaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Solanaceae, Rosaceae, Simaroubaceae, Lardizabalaceae, Liliaceae, Amaranthaceae, Vitaceae, Fabaceae, Primulaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Caryophyllaceae, Asclepiadaceae, Celastraceae, Papaveraceae, Onagraceae, Ranunculaceae, Lamiaceae, Commelinaceae, Scrophulariaceae, Dipsacaceae, Boraginaceae, Equisetaceae, Geraniaceae, Rubiaceae, Cannabaceae, Hypericaceae, Balsaminaceae, Lobeliaceae, Caprifoliaceae, Nyctaginaceae, Oxalidaceae, Vitaceae, Urticaceae, Polypodiaceae, Anacardiaceae, Smilacaceae, Araceae, Campanulaceae, Typhaceae,

Valerianaceae, Verbenaceae, Violaceae. Например, и без ограничения, сорняки могут представлять собой любого представителя из группы, состоящей из *Lolium Rigidum*, *Amaranthus palmeri*, *Abutilon theopratsi*, *Sorghum halepense*, *Conyza Canadensis*, *Setaria verticillata*, *Capsella pastoris* и *Cyperus rotundas*. Дополнительные сорняки включают, например, *Mimosapigra*, *Salvinia*, *Hyptis*, *Senna*, *Noogoora*, *Burr*, *Jatropha gossypifolia*, *Parkinsonia aculeate*, *Chromolaena odorata*, *Cryptoslegia grandiflora* или *Andropogon gayanus*. Сорняки могут включать однодольные растения (например, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Avena*, *Bromus*, *Cyperus*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Lolium*, *Monochoria*, *Rottboellia*, *Sagittaria*, *Scirpus*, *Setaria*, *Sida* или *Sorghum*) или двудольные растения (*Abutilon*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Chrysanthemum*, *Conyza*, *Galium*, *Ipomoea*, *Nasturtium*, *Sinapis*, *Solanum*, *Stellaria*, *Veronica*, *Viola* или *Xanthium*).

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 организма 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 обеспечивать снижение повреждающего эффекта 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 высохших форм. Подробности каждого из этих способов описаны ниже.

В. Доставка вредителю растения

В данном документе представлены способы доставки композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) по отношению к вредителю растения, например, путем приведения вредителя растения в контакт с композицией на основе РМР. В некоторых случаях вредители растения могут быть обработаны посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство. В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, пестицидные средства (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства, нематоциды, моллюскоциды, вируциды или гербициды) или средства для контроля вредителей (например, репелленты). Например, способы могут быть применимы для снижения приспособленности вредителя, например, для предупреждения заражения вредителем или для его обработки вследствие доставки композиции на основе РМР.

В одном аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности вредителя, где способ включает доставку по отношению к вредителю

композиции на основе РМР, описанной в данном документе (например, в эффективном количестве и в течение эффективного периода времени), для снижения приспособленности вредителя по сравнению с необработанным вредителем (например, вредителем, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции на основе РМР).

В одном аспекте в данном документе представлен способ ослабления грибковой инфекции (например, лечения) у растения, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает доставку по отношению к вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе).

В другом аспекте в данном документе представлен способ ослабления грибковой инфекции (например, лечения) у растения, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает доставку по отношению к вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе), и где совокупность РМР содержит противогрибковое средство. В некоторых случаях противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена (например, *dcl1* и *dcl2* (*m. e.*, *dcl1/2*) гриба, вызывающего грибковую инфекцию. В некоторых случаях грибковая инфекция вызвана грибом, принадлежащим к *Sclerotinia* spp. (например, *Sclerotinia sclerotiorum*), *Botrytis* spp. (например, *Botrytis cinerea*), *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. или *Penicillium* spp. В некоторых случаях композиция содержит РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ обеспечивает ослабление или по сути устранение грибковой инфекции.

В другом аспекте в данном документе представлен способ ослабления бактериальной инфекции (например, лечения) у растения, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает доставку по отношению к вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе).

В другом аспекте в данном документе представлен способ ослабления бактериальной инфекции (например, лечения) у растения, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает доставку по отношению к вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР содержит антибактериальное средство. В некоторых случаях антибактериальное средство представляет собой стрептомицин. В некоторых случаях бактериальная инфекция вызывается бактерией, принадлежащей к роду *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas syringae*). В некоторых случаях композиция содержит РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение или в значительной степени устраняет бактериальную инфекцию.

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности насекомого-вредителя растения, где способ включает доставку по

отношению к насекомому-вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе).

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности насекомого-вредителя растения, где способ включает доставку по отношению к насекомому-вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе), и где совокупность РМР содержит инсектицидное средство. В некоторых случаях инсектицидное средство представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях насекомое-вредитель растения представляет собой тлю. В некоторых случаях насекомое-вредитель растения представляет собой чешуекрылое, например, *Spodoptera frugiperda*. В некоторых случаях способ снижает приспособленность насекомого-вредителя растения по сравнению с необработанным насекомым-вредителем растения.

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности нематоды-вредителя растения, где способ включает доставку по отношению к нематоды-вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе).

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности нематоды-вредителя растения, где способ включает доставку по отношению к нематоды-вредителю растения композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе), и где совокупность РМР содержит нематоцидное средство. В некоторых случаях нематоцидное средство представляет собой нейропептид, например, Mi-NLP-15b. В некоторых случаях нематода-вредитель растения представляет собой кукурузную корневую галловую нематоду. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение приспособленности нематоды-вредителя растения по сравнению с необработанной нематодой-вредителем растения.

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности сорняка, где способ включает доставку по отношению к сорняку композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе).

В другом аспекте в данном документе представлен способ снижения приспособленности сорняка, где способ включает доставку по отношению к сорняку композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе), и где совокупность РМР содержит гербицидное средство (например, глюфосинат). В некоторых случаях сорняк представляет собой элевсину индийскую (*Eleusine indica*). В некоторых случаях способ снижает приспособленность сорняка по сравнению с необработанным сорняком.

Снижение приспособленности вредителя в результате доставки композиции на основе РМР может проявляться различными путями. В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде ухудшения или снижения физиологических функций вредителя (например, ухудшение состояния здоровья или выживаемости) как результат доставки композиции на основе РМР. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена посредством одного или нескольких параметров, в том числе без ограничения, скорости размножения, фертильности, продолжительности жизни, жизнеспособности, подвижности, репродуктивной способности, развития вредителя, массы тела, скорости или активности метаболизма или выживаемости по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. Например, способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения общего состояния здоровья вредителя или для снижения общей выживаемости вредителя. В некоторых случаях снижение выживаемости вредителя составляет приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР). В некоторых случаях способы и композиции эффективны для снижения размножения вредителя (например, скорости размножения, фертильности) по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. 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 референтным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у патогена, который не получает композицию для контроля патогенов).

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде снижения образования одного или нескольких питательных веществ в организме вредителя (например, витаминов, углеводов, аминокислот или полипептидов) по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения образования питательных веществ в организме вредителя (например, витаминов, углеводов, аминокислот или полипептидов) на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде повышения восприимчивости вредителя к пестицидному средству и/или снижения устойчивости вредителя к пестицидному средству по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В

некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для_повышения восприимчивости вредителя к пестицидному средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР). Пестицидное средство может представлять собой любое пестицидное средство, известное в данной области техники, в том числе инсектицидные средства. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут повышать восприимчивость вредителя к пестицидному средству посредством снижения способности вредителя метаболизировать пестицидное средство или расщеплять его на пригодные к использованию субстраты по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР.

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде повышения восприимчивости вредителя к аллелохимическому средству и/или снижения устойчивости вредителя к аллелохимическому средству по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения устойчивости вредителя к аллелохимическому средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР). В некоторых случаях аллелохимическое средство представляет собой кофеин, цистатин сои, фенитроцион, монотерпены, дитерпеновые кислоты или фенольные соединения (например, танины, флавоноиды). В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут повышать восприимчивость вредителя к аллелохимическому средству посредством снижения способности вредителя метаболизировать аллелохимическое средство или расщеплять его на пригодные к использованию субстраты по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР.

В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения устойчивости вредителя к паразитам или патогенам (например, грибным, бактериальным или вирусным патогенам или паразитам) по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения устойчивости вредителя к патогену или паразиту (например, грибным, бактериальным или вирусным патогенам; или паразитическим клещам) на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения способности вредителя к переносу или передаче патогена растений (например, вируса растений (например, TYLCV) или бактерии растений (например, *Agrobacterium spp*)) по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. Например, способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения способности вредителя к переносу или передаче патогена растений (например, вируса растений (например, TYLCV)) или бактерии растений (например, *Agrobacterium spp*)) на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР).

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в случаях, когда гербицид включен в РМР или композиции на его основе, способы могут быть дополнительно применяться для снижения приспособленности или уничтожения сорняков. В таких случаях способ может быть эффективным для снижения приспособленности сорняка на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком (например, сорняком, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР). Например, способ может быть эффективным для уничтожения сорняков, уменьшая тем самым популяцию сорняков на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше по сравнению с необработанным сорняком. В некоторых случаях этот способ в значительной степени устраняет сорняк. Примеры сорняков, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, описаны ниже.

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя 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 выдерживать определенный рацион по сравнению с вредителем, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть эффективными для снижения приспособленности вредителя множеством путей, описанных в данном документе. Кроме того, композиция на основе РМР может снижать приспособленность вредителей в любом количестве классов, порядков, семейств, родов или видов вредителей (например, 1 вида вредителей, 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 вредителей). В некоторых случаях композиция на основе РМР действует на один класс, отряд, семейство, род или вид вредителей.

Приспособленность вредителя можно оценивать посредством любых стандартных способов из данной области техники. В некоторых случаях приспособленность вредителя

может быть оценена посредством оценки отдельного вредителя. В качестве альтернативы, приспособленность вредителя может быть оценена посредством оценки популяции вредителей. Например, снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде снижения степени успешной конкуренции по сравнению с другими насекомыми, что тем самым приводит к уменьшению размера популяции вредителей.

i. Грибы

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности гриба, например, для предупреждения или лечения грибковой инфекции у растения. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к грибу путем приведения в контакт гриба с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку композиции на основе РМР по отношению к растению с риском заражения грибковой инфекцией или имеющему ее путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы являются подходящими для доставки по отношению к грибам, которые вызывают грибковые заболевания у растений, в том числе заболевания, вызываемые возбудителями мучнистой росы, например, видами рода *Blumeria*, например *Blumeria graminis*; видами рода *Podosphaera*, например *Podosphaera leucotricha*; видами рода *Sphaerotheca*, например *Sphaerotheca fuliginea*; видами рода *Uncinula*, например *Uncinula necator*; заболевания, вызываемые возбудителями ржавчинного заболевания, например, видами рода *Gymnosporangium*, например *Gymnosporangium sabinae*; видами рода *Hemileia*, например, *Hemileia vastatrix*; видами рода *Phakopsora*, например, *Phakopsora pachyrhizi* и *Phakopsora meibomia*; видами рода *Puccinia*, например, *Puccinia recondite*, *P. triticina*, *P. graminis* или *P. striiformis* или *P. hordei*; видами рода *Uromyces*, например, *Uromyces appendiculatus*; заболевания, вызываемые патогенами из группы *Oomycetes*, например, видами рода *Albugo*, например, *Albugo candida*; видами рода *Bremia*, например, *Bremia lactucae*; видами рода *Peronospora*, например, *Peronospora pisi*, *P. parasitica* или *P. brassicae*; видами рода *Phytophthora*, например, *Phytophthora infestans*; видами рода *Plasmopara*, например, *Plasmopara viticola*; видами рода *Pseudoperonospora*, например, *Pseudoperonospora humuli* или *Pseudoperonospora cubensis*; видами рода *Pythium*, например, *Pythium ultimum*; заболевания, ассоциированные с пятнистостью листьев, и заболевания, ассоциированные с вилтом листьев, вызываемые, например, видами рода *Alternaria*, например, *Alternaria solani*; видами рода *Cercospora*, например, *Cercospora beticola*; видами рода *Cladosporium*, например, *Cladosporium cucumerinum*; видами рода *Cochliobolus*, например, *Cochliobolus sativus* (конидиальная форма: *Drechslera*, Syn: *Helminthosporium*), *Cochliobolus miyabeanus*; видом *Colletotrichum*, например, *Colletotrichum lindemuthanium*; видами рода *Cycloconium*, например, *Cycloconium oleaginum*; видами рода *Diaporthe*, например, *Diaporthe citri*; видами рода *Elsinoe*, например, *Elsinoe fawcettii*; видами рода *Gloeosporium*, например, *Gloeosporium laeticolor*; видами рода *Glomerella*, например, *Glomerella cingulata*; видами

рода *Guignardia*, например, *Guignardia bidwelli*; видами рода *Leptosphaeria*, например, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria nodorum*; видами рода *Magnaporthe*, например, *Magnaporthe grisea*; видами рода *Microdochium*, например, *Microdochium nivale*; видами рода *Mycosphaerella*, например, *Mycosphaerella graminicola*, *M. arachidicola* и *M. fijiensis*; видами рода *Phaeosphaeria*, например, *Phaeosphaeria nodorum*; видами рода *Pyrenophora*, например, *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora tritici repentis*; видами рода *Ramularia*, например, *Ramularia collo-cygni*, *Ramularia areola*; видами рода *Rhynchosporium*, например, *Rhynchosporium secalis*; видом *Septoria*, например, *Septoria apii*, *Septoria lycopersii*; видами рода *Typhula*, например, *Typhula incarnata*; видами рода *Venturia*, например, *Venturia inaequalis*; заболевания корней и стеблей, вызываемые, например, видами рода *Corticium*, например, *Corticium graminearum*; видами рода *Fusarium*, например, *Fusarium oxysporum*; видами рода *Gaeumannomyces*, например, *Gaeumannomyces graminis*; видами рода *Rhizoctonia*, таким как, например, *Rhizoctonia solani*; заболевания, вызываемые *Sarocladium*, например, *Sarocladium oryzae*; заболевания, вызываемые *Sclerotium*, вызываемые, например, *Sclerotium oryzae*; видами рода *Tapesia*, например, *Tapesia acuformis*; видами рода *Thielaviopsis*, например, *Thielaviopsis basicola*; заболевания початков и метелок (в том числе початков кукурузы), вызываемые, например, видами рода *Alternaria*, например, *Alternaria* spp.; видами рода *Aspergillus*, например, *Aspergillus flavus*; видами рода *Cladosporium*, например, *Cladosporium cladosporioides*; видами рода *Claviceps*, например, *Claviceps purpurea*; видами рода *Fusarium*, например, *Fusarium culmorum*; видами рода *Gibberella*, например, *Gibberella zeae*; видами рода *Monographella*, например, *Monographella nivalis*; видами рода *Septoria*, например, *Septoria nodorum*; заболевания, вызываемые головневыми грибами, например, видами рода *Sphacelotheca*, например, *Sphacelotheca reiliana*; видами рода *Tilletia*, например, *Tilletia caries*, *T. controversa*; видами рода *Urocystis*, например, *Urocystis occulta*; видами рода *Ustilago*, например, *Ustilago nuda*, *U. nuda tritici*; плодовая гниль, *вызываемая*, например, видами рода *Aspergillus*, например, *Aspergillus flavus*; видами рода *Botrytis*, например, *Botrytis cinerea*; видами рода *Penicillium*, например, *Penicillium expansum* и *P. purpurogenum*; видами рода *Sclerotinia*, например, *Sclerotinia sclerotiorum*; видами рода *Verticillium*, например, *Verticillium albo-atrum*; гниение, передаваемое через семена и почву, заболевания, вызываемые плесневыми грибами, вилт, гниение и загнивание проростков, например, вызываемые видами рода *Alternaria*, вызываемые, например, *Alternaria brassicicola*; видами рода *Aphanomyces*, вызываемые, например, *Aphanomyces euteiches*; видами рода *Ascochyta*, вызываемые, например, *Ascochyta lentis*; видам *Aspergillus*, вызываемые, например, *Aspergillus flavus*; видами рода *Cladosporium*, например, *Cladosporium herbarum*; видами рода *Cochliobolus*, вызываемые, например, *Cochliobolus sativus*; (конидиальная форма: *Drechslera*, *Bipolaris*, Syn: *Helminthosporium*); видами рода *Colletotrichum*, вызываемые, например, *Colletotrichum coccodes*; видами рода *Fusarium*, вызываемые, например, *Fusarium culmorum*; видами рода *Gibberella*, вызываемые, например, *Gibberella zeae*; видами рода *Macrophomina*, вызываемые, например,

Macrophomina phaseolina; видами рода *Monographella*, вызываемые, например, *Monographella nivalis*; видами рода *Penicillium*, вызываемые, например, *Penicillium expansum*; видам *Phoma*, вызываемые, например, *Phoma lingam*; видами рода *Phomopsis*, вызываемые, например, *Phomopsis sojae*; видами рода *Phytophthora*, вызываемые, например, *Phytophthora cactorum*; видами рода *Pyrenophora*, вызываемые, например, *Pyrenophora graminea*; видами рода *Pyricularia*, вызываемые, например, *Pyricularia oryzae*; видами рода *Pythium*, вызываемые, например, *Pythium ultimum*; видами рода *Rhizoctonia*, вызываемые, например, *Rhizoctonia solani*; видами рода *Rhizopus*, вызываемые, например, *Rhizopus oryzae*; видами рода *Sclerotium*, вызываемые, например, *Sclerotium rolfsii*; видами рода *Septoria*, вызываемые, например, *Septoria nodorum*; видам *Typhula*, вызываемые, например, *Typhula incarnata*; видам *Verticillium*, вызываемые, например, *Verticillium dahliae*; злокачественные опухоли, галлы и виды ведьминых метел, вызываемые, например, видами рода *Nectria*, например, *Nectria galligena*; заболевания, связанные с вилтом, вызываемые, например, видами рода *Monilinia*, например, *Monilinia laxa*; заболевания, связанные с пузырчатостью листьев или курчавостью листьев, вызываемые, например, видами рода *Exobasidium*, например, *Exobasidium vexans*; видами рода *Taphrina*, например, *Taphrina deformans*; заболевания, связанные с увяданием, древесных деревьев, вызываемые, например, заболеванием эска, вызываемые, например, *Phaemoniella clamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* и *Fomitiporia mediterranea*; усыхание, вызванное *Eutypa*, вызванное, например, *Eutypa lata*; заболевания, вызываемые *Ganoderma*, вызываемые, например, *Ganoderma boninense*; заболевания, вызываемые *Rigidoporus*, например, *Rigidoporus lignosus*; заболевания цветков или семян, вызываемые, например, видами рода *Botrytis*, например, *Botrytis cinerea*; заболевания клубней растений, вызываемые, например, видами рода *Rhizoctonia*, например, *Rhizoctonia solani*; видами рода *Helminthosporium*, например, *Helminthosporium solani*; кила, вызванная, например, видами рода *Plasmodiophora*, например, *Plasmodiophora brassicae*; заболевания, вызываемые бактериальными патогенами, например, видами рода *Xanthomonas*, например, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*; видами рода *Pseudomonas*, например, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*; видами рода *Erwinia*, например, *Erwinia amylovora*.

Грибковые заболевания листьев, стеблей, стручков и семян, вызываемые, например, пятнистостью листьев *Alternaria* (*Alternaria* spec. *atrans tenuissima*), антракноз (*Colletotrichum gloeosporoides dematium* var. *truncatum*), бурая пятнистость (*Septoria glycines*), церкоспориозная пятнистость и ожог листьев (*Cercospora kikuchii*), ожог листьев, вызванный *Choanephora* (*Choanephora infundibulifera trispora* (Syn.)), ожог листьев, вызванный *Dactuliophora* (*Dactuliophora glycines*), ложная мучнистая роса (*Peronospora manshurica*), ожог, вызванный *Drechslera* (*Drechslera glycini*), сененофомозная пятнистость злаковых трав (*Cercospora sojae*), пятнистость листьев, вызванная *Leptosphaerulina* (*Leptosphaerulina trifolii*), пятнистость листьев, вызванная *Phyllosticta* (*Phyllosticta sojaecola*), ожог стручков и стеблей (*Phomopsis sojae*), настоящая мучнистая роса (*Microsphaera diffusa*), пятнистость листьев, вызванная *Pyrenochaeta*

(*Pyrenochaeta glycines*), ожог вследствие ризоктониоза, воздушного, листовного и сетчатого ожога (*Rhizoctonia solani*), ржавчина (*Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora meibomia*), парша (*Sphaceloma glycines*), ожог листьев вследствие стемфилиоза (*Stemphylium botryosum*), мишеневидная пятнистость (*Corynespora cassiicola*).

Грибковые заболевания корней и основания стебля, вызываемые, например, черной корневой гнилью (*Calonectria crotalariae*), угольной гнилью (*Macrophomina phaseolina*), фузариозной гнилью или вилтом, корневой гнилью, стручковой гнилью и гнилью ветвей (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium orthoceras*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti*), корневой гнилью, вызываемой *Mycoleptodiscus* (*Mycoleptodiscus terrestris*), неокосмоспориозом (*Neocosmospora vasinfecta*), ожогом стручков и стеблей (*Diaporthe phaseolorum*), раком стебля (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*), фитофторозной гнилью (*Phytophthora megasperma*), бурой гнилью стеблей сои (*Phialophora gregata*), грибковой гнилью (*Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium myriotylum*, *Pythium ultimum*), корневой гнилью, стеблевой гнилью и ризоктиниозом, вызываемыми *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), склеротиниозом стеблей (*Sclerotinia sclerotiorum*), южным склеротиниозом стеблей (*Sclerotinia rolfsii*), корневой гнилью, вызываемой *Thielaviopsis* (*Thielaviopsis basicola*).

В определенных случаях гриб представляет собой *Sclerotinia* spp (*Sclerotinia sclerotiorum*). В определенных случаях гриб представляет собой *Botrytis* spp (например, *Botrytis cinerea*). В определенных случаях гриб представляет собой *Aspergillus* spp. В определенных случаях гриб представляет собой *Fusarium* spp. В определенных случаях гриб представляет собой *Penicillium* spp.

Композиции по настоящему изобретению пригодны в различных путях применения для контроля грибов. Вышеописанные композиции можно использовать для контроля грибковых фитопатогенов до сбора урожая или грибковых патогенов после сбора урожая. В одном варианте осуществления любую из описанных выше композиций используют для контроля целевых патогенов, таких как виды *Fusarium*, виды *Botrytis*, виды *Verticillium*, виды *Rhizoctonia*, виды *Trichoderma* или *Pythium*, путем нанесения композиции на растения, участок, окружающий растения, или съедобные культивируемые грибы, грибницу или грибной компост. В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению применяют для контроля патогенов после сбора урожая, таких как виды *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus niger* или *Colletotrichum*.

В таблице 6 представлены дополнительные примеры грибов и ассоциированных с ними заболеваний растений, которые можно обрабатывать или предупреждать их с использованием композиции на основе РМР и соответствующих способов, описанных в данном документе.

Таблица 6. Грибковые вредители

Заболевание	Возбудитель
Ожог листьев пшеницы, вызываемый <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria triticina</i>
Пятнистость листьев капустных культур, вызываемая <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria japonica</i>
Американская ржавчина сои	<i>Phakopsora meibomia</i>
Ржавчина виноградовника	<i>Phakopsora ampelopsidis</i>
Анемон	<i>Ochropsora ariae</i>
Угловая пятнистость листьев цитруса	<i>Pseudocercospora angolensis</i>
Ржавчина малины полярной	<i>Phragmidium arcticum</i>
Аскохитоз кормовых бобов	<i>Didymella fabae</i>
Усыхание ясеня	<i>Chalara fraxinea</i>
Азиатская ржавчина горной розы	<i>Phragmidium butleri</i>
Азиатская ржавчина лещины	<i>Pucciniastrum coryli</i>
Азиатская ржавчина розы, вызываемая <i>Kuehneola</i>	<i>Kuehneola japonica</i>
Азиатская ржавчина горной малины	<i>Phragmidium assamense</i>
Азиатская ржавчина малины, вызываемая <i>Phragmidium</i>	<i>Phragmidium arisanense</i>
Азиатская ржавчина фисташек	<i>Pileolaria pistaciae</i>
Азиатская ржавчина розы	<i>Gerwasia rosae</i>
Азиатская ржавчина малины	<i>Hamasporea hashiokai</i>
Азиатская ржавчина сои	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>
Азиатская головня сахарного тростника	<i>Sporisorium sacchari</i>
Азиатская бородавчатость коры, пузырчатый рак, кольцевая гниль, рак груши или яблони, вызываемый <i>Phyalospora</i>	<i>Botryosphaeria berengeriana</i> f. sp. <i>pyricola</i>
Азиатская/европейская коричневая гниль розоцветных	<i>Monilinia fructigena</i>
Азиатская коричневая гниль плодов	<i>Monilia polystroma</i>
Азиатская ржавчина малины типа <i>Barclay</i>	<i>Phragmidium barclayi</i>
Черный ожог листьев сои	<i>Arkoola nigra</i>
Пузырчатый ожог чая	<i>Exobasidium vexans</i>
Синева древесины монгольского дуба	<i>Ophiostoma longicollum</i>
Ржавчина самшита или ржавчина древесины	<i>Puccinia buxi</i>

самшита	
Коричневая ржавчина сахарного тростника	<i>Puccinia melanocephala</i>
Ожог листьев вишни	<i>Apiognomonium erythrostoma</i>
Шоколадная пятнистость груш Ya Li	<i>Alternaria yaliinficiens</i>
Белая ржавчина хризантем	<i>Puccinia horiana</i>
Ржавчина листьев кофейного дерева	<i>Hemileia vastatrix</i>
Обыкновенная ржавчина малины азиатской	<i>Hamasporea acutissima</i>
Лиственница обыкновенная	<i>Melampsora capraearum</i>
Обыкновенная ржавчина картофеля и томата	<i>Puccinia pittieriana</i>
Усыхание сосны, вызываемое <i>Crumenulopsis</i>	<i>Crumenulopsis sororia</i>
Ржавчина лилейника	<i>Puccinia hemerocallidis</i>
Ложная мучнистая роса наперстянки	<i>Peronospora digitalis</i>
Ложная мучнистая роса бальзаминов (<i>Plasmopara</i>)	<i>Plasmopara obducens</i>
Баклажан	<i>Puccinia substriata</i> var. <i>substriata</i>
Спорынья проса африканского	<i>Claviceps fusiformis</i>
Рак лиственницы европейской	<i>Lachnellula willkommii</i>
Гнездоразрывная ржавчина азиатской малины	<i>Phragmidium pauciloculare</i>
Стеблевая головня пшеницы	<i>Urocystis agropyri</i>
Ржавчина гладиолусов	<i>Uromyces transversalis</i>
<i>Goplana dioscoreae</i>	<i>Goplana dioscoreae</i>
Ржавчина листьев винограда	<i>Phakopsora euvtis</i>
Серая ржавчина малины	<i>Phragmidium griseum</i>
Ржавчина гималайского рододендрона	<i>Chrysomyxa himalensis</i>
Ржавчина малины Hiratsuka	<i>Phragmidium hiratsukanum</i>
Лошадиный зуб или спорынья маиса	<i>Claviceps gigantea</i>
Ржавчина японской яблони	<i>Gymnosporangium yamadae</i>
Японский кипарисовик	<i>Gymnosporangium miyabei</i>
Японская спорынья сорго	<i>Claviceps sorghicola</i>
Ржавчина камчатской розы	<i>Phragmidium kamtschatkae</i>
Поздний вилт маиса	<i>Harpophora maydis</i>
Длинноспоровая азиатская ржавчина малины	<i>Hamasporea longissima</i>
Заболевание мальсекко цитруса	<i>Phoma tracheiphila</i>
Китайский тростник	<i>Puccinia miscanthi</i>

Ржавчина шелковицы	<i>Aecidium mori</i>
Ржавчина малины Nambu	<i>Phragmidium nambuenum</i>
Гниль шейки лука	<i>Ciborinia allii</i>
Ржавчина малины новозеландской	<i>Hamaspora australis</i>
Северная синяя гниль сосны	<i>Leptographium wingfieldii</i>
Северная сосна	<i>Chrysomyxa rhododendri</i>
Вилт дуба	<i>Ceratocystis fagacearum</i>
Оранжевая ржавчина сахарного тростника	<i>Puccinia kuehnii</i>
<i>Peronospora radii</i>	<i>Peronospora radii</i>
Ржавчина фисташек	<i>Pileolaria terebinthi</i>
Парша пуансеттии	<i>Sphaceloma poinsettiae</i>
Головня картофеля	<i>Thecaphora solani</i>
<i>Puccinia gladioli</i> , поражающая растения рода <i>Gladiolus</i>	<i>Puccinia gladioli</i>
<i>Puccinia glyceriae</i> (anam. <i>Aecidium hydrangea</i>)	<i>Puccinia glyceriae</i>
<i>Puccinia mcleanii</i> , поражающая растения рода <i>Gladiolus</i>	<i>Puccinia mcleanii</i>
<i>Puccinia psidii</i>	<i>Puccinia psidii</i>
<i>Pucciniastrum actinidiae</i> , поражающая <i>Actinidia</i> spp.	<i>Pucciniastrum actinidiae</i>
Красная ржавчина китайского тростника	<i>Puccinia erythropus</i>
Ржавчина ежевики кустистой	<i>Phragmidium bulbosum</i>
Ржавчина костяники	<i>Phragmidium acuminatum</i>
Ржавчина малины азиатской	<i>Gerwasia rubi</i>
Ржавчина малины южно-американской	<i>Gerwasia imperialis</i>
Ржавчина стебля шотландской сосны	<i>Cronartium flaccidum</i>
Ожог побегов самшита	<i>Calonectria pseudonaviculata</i>
Гриб <i>Sirex wasp</i>	<i>Amylostereum areolatum</i>
Паслен	<i>Puccinia agrophila</i>
Ржавчина малины южно-американской	<i>Gerwasia mayorii</i>
Головня дикого сахарного тростника, вызываемая грибами рода <i>Sporisorium</i>	<i>Sporisorium pulverulentum</i>
Ржавчина хвои елей	<i>Chrysomyxa abietis</i>
Трихоконииоз, гниль всходов, пятнистость	<i>Alternaria padwickii</i>

листьев риса	
Внезапное опадение хвои елей (SNEED)	Setomelanomma holmii
Сахарная болезнь или азиатская спорынья сорго	Claviceps sorghi
Ржавчина батата	Endophyllum kaernbachii
Ржавчина тайваньской малины	Phragmidium formosanum
Смолистая пятнистость кукурузы	Phyllachora maydis
Ржавчина тика	Olivea tectonae
Thekopsora areolate	Thekopsora areolata
Болезнь, вызывающая опадение плодов баклажана	Diaporthe vexans
Тропическая американская ржавчина малины Kuehneola	Kuehneola loeseneriana
Тропическая американская ржавчина малины Mainsia	Mainsia rubi
Тропическая ржавчина сои	Aecidium glycines
Uromyces gladioli, поражающий растения рода Gladiolus	Uromyces gladioli
Uromyces nyikensis, поражающий растения рода Gladiolus	Uromyces nyikensis
Uromycladium tepperianum, поражающий Acacia spp.	Uromycladium tepperianum
Различные виды малины	Gerwasia variabilis
Ржавчина малины японской	Hamaspora sinica var. sinica
Ржавчина малины Yamada	Phragmidium yamadanum
Антракноз, пятнистость листьев и гниль стебля	Colletotrichum graminicola anthracnose (телеоморф: Glomerella graminicola), Glomerella tucumanensis (анаморф: Glomerella falcatum)
Фузариоз початков и зерен, вызванный Aspergillus	Aspergillus flavus
Полосатость листьев и пятнистость влагалища листа	Rhizoctonia solani=Rhizoctonia microsclerotia (телеоморф: Thanatephorus cucumeris)

Ржавчина бобов	<i>Uromyces appendiculatus</i>
Почернение сосудистых пучков	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Гниль, вызывающая почернение зерен	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Буря пятнистость (черная пятнистость, гниль стебля)	<i>Physoderma maydis</i>
Ложная мучнистая роса при сколекотриозе	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Гниль зерна, вызванная <i>Cephalosporium</i>	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Угольная гниль	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Обычная ржавчина кукурузы	<i>Puccinia sorghi</i>
Южная ржавчина кукурузы	<i>Puccinia polysora</i>
Тропическая ржавчина кукурузы	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiospora zeae</i>
Гниль початков, вызванная <i>Corticium</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
Ржавчина хлопчатника	<i>Puccinia schedonnardi</i>
Юго-западная ржавчина хлопчатника	<i>Puccinia cacabata</i>
Тропическая ржавчина хлопчатника	<i>Phakopsora gossypii</i>
Акромания при ложной мучнистой росе	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>S. macrospora</i>
Пятнистость листьев, вызванная <i>Curvularia</i>	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> ,= <i>C. maculans</i> (телеоморф: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (телеоморф: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (телеоморф: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallescens</i> (телеоморф: <i>Cochliobolus pallescens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (телеоморф: <i>Cochliobolus</i>

	tuberculatus)
Пятнистость листьев, вызванная <i>Didymella</i>	<i>Didymella exitialis</i>
Гниль початков и <i>гниль</i> стебля, вызванные <i>Diplodia</i>	<i>Diplodia frumenti</i> (телеоморф: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
Гниль початков, гниль стебля, <i>гниль семян и белая гниль всходов</i> , вызванные <i>Diplodia</i>	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
Пятнистость листьев и <i>полосатость</i> листьев, вызванная <i>Diplodia</i>	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospore</i>
Ложная мучнистая роса листьев винограда	<i>Plasmopara viticola</i>
Сухая гниль початков (гниль початка, зерна и стебля)	<i>Nigrospora oryzae</i> (телеоморф: <i>Khuskia oryzae</i>)
Гнили початков, незначительная	<i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
<i>epitea</i>	<i>Melampsora larici</i>
Спорынья (лошадиный зуб, <i>diente del caballo</i>)	<i>Claviceps gigantea</i> (анаморф: <i>Sphacelia</i> sp.)
Глазковая пятнистость	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
Гниль початков и стебля <i>Diplodia</i>	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
Гниль зерна, корней и <i>стебля</i> , <i>гниль семян и белая гниль всходов</i> , вызванная <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium moniliforme</i> (телеоморф: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
Гниль стебля, <i>гниль корней</i> всходов, вызванные <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium avenaceum</i> (телеоморф: <i>Gibberella avenacea</i>)
Гниль початков и стебля, вызываемая <i>Gibberella</i>	<i>Gibberella zeae</i> (анаморф: <i>Fusarium graminearum</i>)
Серая гниль початков	<i>Botryosphaeria zeae</i> = <i>Physalospora zeae</i> (анаморф: <i>Macrophoma zeae</i>)
Серая пятнистость листьев (<i>Cercospora</i>	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var.

	maydis, <i>C. zeae-maydis</i> leaf spot)
Зеленые початки при ложной мучнистой росе	<i>Sclerospora graminicola</i>
Гниль початков, вызванная <i>Helminthosporium</i> (<i>раса 1</i>)	<i>Bipolaris zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i>
Гниль корней, вызванная <i>Helminthosporium</i>	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (<i>телеоморф</i> : <i>Setosphaeria</i>)
Гниль початков, вызванная <i>Hormodendrum</i> (<i>гниль, вызванная Cladosporium</i>)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (<i>телеоморф</i> : <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Пятнистость листьев, вызванная <i>Hyalothyridium</i>	<i>Hyalothyridium maydis</i>
Ложная мучнистая роса яванского кофе	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
Поздний вилт	<i>Cephalosporium maydis</i>
Ржавчина листьев (бурая)	<i>Puccinia recondita</i> (<i>анаморф</i> : <i>Aecidium clematitidis</i>)
Пятнистость листьев, незначительная	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta maydis</i> , <i>A. tritici</i> , <i>A. zeicola</i> , <i>Bipolaris victoriae</i> = <i>Helminthosporium victoriae</i> (<i>телеоморф</i> : <i>Cochliobolus victoriae</i>), <i>C. sativus</i> (<i>анаморф</i> : <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H. Exserohilum maydis</i> , <i>Leptothyrium zeae</i> , <i>Ophiosphaerella herpotricha</i> , <i>Setosphaeria prolata</i>) <i>Graphium penicillioides</i> , <i>Leptosphaeria prolata</i> = <i>Drechslera prolata</i> (<i>телеоморф</i> : <i>sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i>), <i>Epicoccum nigrum</i> , (<i>анаморф</i> : <i>Scolecosporella sp.</i>), <i>Paraphaeosphaeria michotii</i> , <i>Phoma sp.</i> , <i>Septoria zeae</i> , <i>S. zeicola</i> , <i>S. zeina</i>
Ржавчинные грибы	<i>Puccinia veronicae-longifoliae</i>

Ржавчина мускусной розы	Phragmidium rosae-moschatae
Ржавчина розы многоцветковой	Phragmidium rosae-multiflorae
Северный ожег листьев кукурузы	Exaerohilum turcicum=Helminthosporium turcicum, Setosphaeria turcica
Северная пятнистость листьев кукурузы	Cochliobolus carbonum
Корончатая ржавчина овса	Puccinia coronata
Стеблевая ржавчина овса	Puccinia graminis
Ржавчина арахиса	Puccinia arachidis
Гниль початков, вызванная Penicillium (голубой глаз, голубая плесень)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
Ржавчина чернолоза-лиственницы	Melampsora larici-pentandrae
Гниль стебля и гниль корня, вызванная Phaeocystostroma	Phaeocystostroma ambiguum, Phaeocystosporella zeae
Пятнистость листьев, вызванная Phaeosphaeria	Phaeosphaeria maydis, Sphaerulina maydis
Филиппинская ложная мучнистая роса	Peronosclerospora philippinensis=Sclerospora philippinensis
Гниль початков, вызванная Physalospora	Botryosphaeria Botryosphaeria festucae=Physalospora zeicola, (анаморф: Diplodia frumenti)
Обычная ржавчина картофеля	Puccinia pittieriana
Деформирующая ржавчина картофеля	Aecidium cantensis
Зерновые и травы Настоящая мучнистая роса	Erysiphe graminis
Настоящая мучнистая роса розы	Sphaerotheca pannosa
Настоящая мучнистая роса пшеницы	Blumeria graminis f. sp. tritici,
Настоящая мучнистая роса ячменя	Blumeria graminis f. sp. hordei
Настоящая мучнистая роса винограда	Microsphaera diffusa
Настоящая мучнистая роса бобовых	Erysiphe necator (или Uncinula necator)
Настоящая мучнистая роса винограда	Leveillula taurica, или Oidiopsis taurica
Настоящая мучнистая роса лука	Podosphaera leucotricha
Настоящая мучнистая роса яблони	Podosphaera xanthii, Erysiphe

	cichoracearum, Podosphaera fusca, Leveillula taurica
Настоящая мучнистая роса тыквенных	Microsphaera syringae
Настоящая мучнистая роса лилейных	Podosphaera aphanis, Geum rivale
Настоящая мучнистая роса клубники	Erysiphe berberidis
Настоящая мучнистая роса боярышника	Podosphaera oxycanthae
Настоящая мучнистая роса крыжовника	Sphaerotheca mors-uvae
Пурпурное листовое влагалище	Hemiparasitic bacteria и fungi
Гниль стебля и гниль корня, вызванная Pyrenochaeta	Phoma terrestris, Pyrenochaeta terrestris
Гниль корня, вызванная Pythium	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Гниль стебля, вызванная Pythium	Pythium aphanidermatum=P. butleri L.
Болезнь красных зерен (плесень початков кукурузы, гниль листьев и семян)	Epicoccum nigrum
Початок кукурузы, пораженный Rhizoctonia	Rhizoctonia zeae (телеоморф: Waitea circinata)
Гниль корней и гниль стебля, вызванная Rhizoctonia	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
Виды гнили корней, незначительная	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (телеоморф: Gibberella acuminata), F. equiseti (телеоморф: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, F. cyanogena, (анаморф: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Пятнистость листьев, вызванная Rostratum (болезнь листьев, гниль початков и стебля)	Setosphaeria rostrata, Helminthosporium (анаморф: Exserohilum rostratum=Helminthosporium

	rostratum)
rugosae	Phragmidium rosae
Ржавчина, обычная кукуруза	Puccinia sorghi
Ржавчина, южная кукуруза	Puccinia polysora
Ржавчина, тропическая кукуруза	Physopella pallescens, P. zae= Angiospora zae
sativae	Balansia oryzae
Гниль початков, вызванная Sclerotium (южный ожег)	Sclerotium rolfsii (телеоморф: Athelia rolfsii)
Гниль семян-ожег сеянцев	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola=Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum=Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zae (анаморф: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Пятнистость листьев, вызванная Selenophoma	Selenophoma sp.
Гниль влагалища	Gaeumannomyces graminis
Гниль шелухи	Myrothecium gramineum
sieboldii	Hamaspora rubi
Плесень силоса	Monascus purpureus, M. rubber
Головня, обычная	Ustilago zae=U. maydis
Головня, ложная	Ustilaginoidea virens
Головня, головок	Sphacelotheca reiliana=Sporisorium holci-sorghum
Ложная мучнистая роса Sorghum	Peronosclerospora sorghi=Sclerospora sorghi
Южная пятнистость листьев и гниль стебля кукурузы	Cochliobolus heterostrophus (анаморф: Bipolaris maydis=Helminthosporium

	maydis)
Южная пятнистость листьев	Stenocarpella macrospora=Diplodia macrospora
Ржавчина сои	Phakopsora pachyrhizi
Ложная мучнистая роса Spontaneum	Peronosclerospora spontanea=Sclerospora spontanea
Гниль стеблей, незначительная	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum, F. poae, F. roseum, F. solani (телеоморф: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
Ржавчина стебля	Puccinia graminis=P. graminis f. sp. secalis
Виды белой гнили	Aspergillus spp., Penicillium spp. и другие грибы
Обычная ржавчина сахарного тростника	Puccinia melanocephala=P. eriantha
Ложная мучнистая роса сахарного тростника	Peronosclerospora sacchari=Sclerospora sacchari
Смолистая пятнистость	Phyllachora maydis
thunbergii	Phragmidium rubi
Гниль початков и гниль корня, вызванная Trichoderma	Trichoderma viride=T. lignorum (телеоморф: Hypocrea sp.)
Ржавчина листьев пшеницы (бурая)	Puccinia triticina=P. Recondita f. Sp. tritici=P. tritici-duri
Ржавчина стебля пшеницы (черная)	Puccinia graminis=P. graminis f. sp. tritici
Ржавчина стебля пшеницы (желтая)	Puccinia striiformis (анаморф: P. uredoglumarum)
Белая гниль початков, гниль корней и стебля	Stenocarpella maydis=Diplodia zeae
Желтый ожег листьев	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (телеоморф: Mycosphaerella zeae-maydis)

ii. Бактерии

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности бактерии, например, для предупреждения или лечения бактериальной инфекции у растения. Представлены способы доставки композиции на основе РМР бактерии путем приведения в контакт бактерии с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку биопестицида по отношению к растению с риском заражения бактериальной инфекцией или имеющему ее путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы являются пригодными для доставки по отношению к бактериям или растению, зараженному ими, в том числе любыми бактериями, дополнительно описанными ниже. Например, бактерии могут представлять собой бактерии, принадлежащие типу Actinobacteria или Proteobacteria, такие как бактерии в семействах Burkholderiaceae, Xanthomonadaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Microbacteriaceae и Rhizobiaceae.

В некоторых случаях бактерия представляет собой подвиды *Acidovorax avenae*, в том числе, например, *Acidovorax avenae* подвид *avenae* (=Pseudomonas avenae subsp. avenae), *Acidovorax avenae* подвид *cattleyae* (=Pseudomonas cattleyae) или *Acidovorax avenae* подвид *citrulli* (=Pseudomonas pseudoalcaligenes подвид *citrulli*, Pseudomonas avenae подвид *citrulli*).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Burkholderia* spp., в том числе, например, *Burkholderia andropogonis* (=Pseudomonas andropogonis, Pseudomonas woodsii), *Burkholderia caryophylli* (=Pseudomonas caryophylli), *Burkholderia cepacia* (=Pseudomonas cepacia), *Burkholderia gladioli* (=Pseudomonas gladioli), *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* (=Pseudomonas gladioli pv. agaricicola), *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (т. е., Pseudomonas gladioli pv. alliicola), *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (т. е., Pseudomonas gladioli, Pseudomonas gladioli pv. gladioli), *Burkholderia glumae* (т. е., Pseudomonas glumae), *Burkholderia plantarii* (т. е., Pseudomonas plantarii), *Burkholderia solanacearum* (т. е., Ralstonia solanacearum), или *Ralstonia* spp.

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Liberibacter* spp., в том числе, Candidatus *Liberibacter* spec., в том числе, например, Candidatus *Liberibacter asiaticus*, *Liberibacter africanus* (Laf), *Liberibacter americanus* (Lam), *Liberibacter asiaticus* (Las), *Liberibacter europaeus* (Leu), *Liberibacter psyllaureus*, или *Liberibacter solanacearum* (Lso).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Corynebacterium* spp., в том числе, например, *Corynebacterium fascians*, *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Corynebacterium michiganensis*, *Corynebacterium michiganense* pv. *tritici*, *Corynebacterium michiganense* pv. *nebraskense*, или *Corynebacterium sepedonicum*.

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Erwinia* spp., в том числе, например, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananas*, *Erwinia carotovora* (т. е., Pectobacterium carotovorum), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*,

Erwinia chrysanthemi, *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia rhapontic*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, или *Erwinia uredovora*.

В некоторых случаях бактерия представляет собой подвид *Pseudomonas syringae*, в том числе, например, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, *Pseudomonas syringae* pv. *striaefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, или *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Streptomyces* spp., в том числе, например, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces candidus* (т. е., *Actinomyces candidus*), *Streptomyces caviscabies*, *Streptomyces collinus*, *Streptomyces europaeiscabiei*, *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces ipomoeae*, *Streptomyces luridiscabiei*, *Streptomyces niveiscabiei*, *Streptomyces puniscabiei*, *Streptomyces reticuliscabiei*, *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces scabies*, *Streptomyces setonii*, *Streptomyces steliiscabiei*, *Streptomyces turgidiscabies*, или *Streptomyces wedmorensis*.

В некоторых случаях бактерия представляет собой подвид *Xanthomonas axonopodis*, в том числе, например, *Xanthomonas axonopodis* pv. *alfalfae* (= *Xanthomonas alfalfae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (= *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *allii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *bauhiniae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *bauhiniae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *betlicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *betlicola*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *biophyti* (= *Xanthomonas campestris* pv. *biophyti*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *cajani* (= *Xanthomonas campestris* pv. *cajani*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *cassavae* (= *Xanthomonas cassavae*, *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *cassiae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *cassiae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (= *Xanthomonas citri*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (= *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *clitoriae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *clitoriae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *coracanae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *coracanae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *desmodii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *desmodii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *desmodiiigangetici* (= *Xanthomonas campestris* pv. *desmodiiigangetici*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *desmodiilaxiflori* (= *Xanthomonas campestris* pv. *desmodiilaxiflori*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *desmodiirotundifolii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *desmodiirotundifolii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *erythrinae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *erythrinae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *fascicularis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *fasciculari*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (= *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *khayae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *khayae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *lespedezae* (= *Xanthomonas campestris* pv.

lespedezae), *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *maculifoliigardeniae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (= *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *martyiicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *martyiicola*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *melhusii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *melhusii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *nakataecorchori* (= *Xanthomonas campestris* pv. *nakataecorchori*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *patelii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *patelii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *pedalii* (= *Xanthomonas campestris* pv. *pedalii*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (= *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas phaseoli*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (= *Xanthomonas fuscans*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phyllanthi* (= *Xanthomonas campestris* pv. *phyllanthi*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *physalidicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *physalidicola*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *poinsettiicola*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *punicae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *rhynchosiae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *rhynchosiae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *ricini* (= *Xanthomonas campestris* pv. *ricini*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *sesbaniae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *sesbaniae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *tamarindi* (= *Xanthomonas campestris* pv. *tamarindi*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignaeradiatae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*), или *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (= *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), или *Xanthomonas fragariae*.

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Xanthomonas translucens* supsp. (= *Xanthomonas campestris* pv. *hordei*) в том числе, например, *Xanthomonas translucens* pv. *arrhenatheri* (= *Xanthomonas campestris* pv. *arrhenatheri*), *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*), *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *graminis*), *Xanthomonas translucens* pv. *phlei* (= *Xanthomonas campestris* pv. *phlei*), *Xanthomonas translucens* pv. *phleipratensis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *phleipratensis*), *Xanthomonas translucens* pv. *poae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *poae*), *Xanthomonas translucens* pv. *secalis* (= *Xanthomonas campestris* pv. *secalis*), *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (= *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*), или *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (= *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa*).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Xanthomonas oryzae* supsp., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (= *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*), или *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (= *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*).

В некоторых случаях бактерия представляет собой *Xylella fastidiosa* из семейства Xanthomonadaceae.

В таблице 7 представлены дополнительные примеры бактерий и ассоциированных с ними заболеваний, которые можно лечить или предупреждать с использованием композиции на основе РМР и соответствующих способов, описанных в данном документе.

Таблица 7. Бактерии-вредители

Заболевание	Возбудитель
Бактериальный ожог листьев и гниль стебля	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Бактериальная пятнистость листьев	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Бактериальная гниль стебля	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Бактериальная гниль стебля и верхушки	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>Zea</i>
Бактериальная полосатость	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Шоколадная пятнистость	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Coronafaciens</i>
Бактериальная увядание (веснучатость листьев и вилт)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Cornebacterium michiganense</i> pv. <i>Nebraskense</i>
Пятнистость <i>Holcus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>
Пурпурное листовое влагалище	Полупаразитические бактерии
Гниль семян-ожог сеянцев	<i>Bacillus subtilis</i>
Бактериоз початков кукурузы (бактериальный вилт)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Остановка роста зерен (остановка роста Mesa Central или Rio Grande)	<i>Achapparramiento</i> , карликовость, <i>Spiroplasma kunkelii</i>
Мягкая гниль	<i>Dickeya dianthicola</i>
Мягкая гниль	<i>Dickeya solani</i>
Красная бактериальная гниль	<i>Erwinia amylovora</i>
Мягкая гниль	<i>P. atrosepticum</i>
Мягкая гниль	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>
Мягкая гниль	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
Бактериальный ожог	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Porri</i> и pv. <i>Tomato</i>
Бурая бородавчатость	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
Бактериальный вилт	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Бактериальный вилт	<i>Ralstonia solanacearum</i>

Обыкновенная парша	<i>Streptomyces scabies</i>
Обыкновенная парша	<i>Streptomyces scabies</i>
Ожег лука, вызванный <i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>
Азиатский рак цитруса	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Бактериальная пятнистость цитруса	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>
Бактериальная пятнистость	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Пайерсова болезнь	<i>Xylella fastidiosa</i>

iii. Насекомые

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности насекомого, например для предупреждения или лечения заражения, вызываемого насекомым, у растения. 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. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к насекомому путем приведения в контакт насекомого с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку биопестицида по отношению к растению с риском заражения, вызываемого насекомым, или зараженному им, путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы являются пригодными для предупреждения или лечения заражения, вызываемого насекомым, или растения, зараженного им, в том числе насекомыми, принадлежащими к следующим отрядам: *Acari*, *Araneae*, *Anoplura*, *Coleoptera*, *Collembola*, *Dermaptera*, *Dictyoptera*, *Diplura*, *Diptera* (например, пестрокрылая *Drosophila*), *Embiodera*, *Ephemeroptera*, *Grylloblatodea*, *Hemiptera* (например, тли, тепличная белокрылка), *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Isoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Mecoptera*, *Neuroptera*, *Odonata*, *Orthoptera*, *Phasmida*, *Plecoptera*, *Protura*, *Psocoptera*, *Siphonaptera*, *Siphunculata*, *Thysanura*, *Strepsiptera*, *Thysanoptera*, *Trichoptera* или *Zoraptera*.

В некоторых случаях насекомое относится к классу *Arachnida*, например *Acarus* spp., *Aceria sheldoni*, *Aculops* spp., *Aculus* spp., *Amblyomma* spp., *Amphitetranychus viennensis*, *Argas* spp., *Boophilus* spp., *Brevipalpus* spp., *Bryobia graminum*, *Bryobia praetiosa*, *Centruroides* spp., *Chorioptes* spp., *Dermanyssus gallinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermacentor* spp., *Eotetranychus* spp., *Epitrimerus pyri*, *Eutetranychus* spp., *Eriophyes* spp., *Glycyphagus domesticus*, *Halotydeus destructor*, *Hemitarsonemus* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp., *Latrodectus* spp., *Loxosceles* spp., *Metatetranychus* spp., *Neutrombicula autumnalis*, *Nuphessa* spp., *Oligonychus* spp., *Ornithodoros* spp., *Ornithonyssus* spp., *Panonychus* spp., *Phyllocoptruta oleivora*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Psoroptes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Rhizoglyphus* spp., *Sarcoptes* spp., *Scorpio maurus*, *Steneotarsonemus* spp., *Steneotarsonemus spinki*, *Tarsonemus* spp., *Tetranychus* spp., *Trombicula alfreddugesi*, *Vaejovis* spp., или *Vasates lycopersici*.

В некоторых случаях насекомое относится к классу Chilopoda, например *Geophilus* spp. или *Scutigera* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Collembola, например *Onychiurus armatus*.

В некоторых случаях насекомое относится к классу Diplopoda, например *Blaniulus guttulatus*;

к классу Insecta, например к отряду Blattodea, например *Blattella asahinai*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis*, *Leucophaea maderae*, *Panchlora* spp., *Parcoblatta* spp., *Periplaneta* spp., или *Supella longipalpa*.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Coleoptera, например, *Acalymma vittatum*, *Acanthoscelides obtectus*, *Adoretus* spp., *Agelastica alni*, *Agriotes* spp., *Alphitobius diaperinus*, *Amphimallon solstitialis*, *Anobium punctatum*, *Anoplophora* spp., *Anthonomus* spp., *Anthrenus* spp., *Apion* spp., *Apogonia* spp., *Atomaria* spp., *Attagenus* spp., *Bruchidius obtectus*, *Bruchus* spp., *Cassida* spp., *Cerotoma trifurcata*, *Ceutorrhynchus* spp., *Chaetocnema* spp., *Cleonus mendicus*, *Conoderus* spp., *Cosmopolites* spp., *Costelytra zealandica*, *Ctenicera* spp., *Curculio* spp., *Cryptolestes ferrugineus*, *Cryptorhynchus lapathi*, *Cylindrocopturus* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp. (например, западный кукурузный жук), *Dichocrocis* spp., *Dicladispa armigera*, *Diloboderus* spp., *Epilachna* spp., *Epitrix* spp., *Faustinus* spp., *Gibbium psylloides*, *Gnathocerus cornutus*, *Hellula undalis*, *Heteronychus arator*, *Heteronyx* spp., *Hylamorpha elegans*, *Hylotrupes bajulus*, *Hypera postica*, *Hypomeces squamosus*, *Hypothenemus* spp., *Lachnosterna consanguinea*, *Lasioderma serricorne*, *Latheticus oryzae*, *Lathridius* spp., *Lema* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Leucoptera* spp., *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Lixus* spp., *Luperodes* spp., *Lyctus* spp., *Megascelis* spp., *Melanotus* spp., *Meligethes aeneus*, *Melolontha* spp., *Migdolus* spp., *Monochamus* spp., *Naupactus xanthographus*, *Necrobia* spp., *Niptus hololeucus*, *Oryctes rhinoceros*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Oryzaphagus oryzae*, *Otiorrhynchus* spp., *Oxycetonia jucunda*, *Phaedon cochleariae*, *Phyllophaga* spp., *Phyllophaga helleri*, *Phyllotreta* spp., *Popillia japonica*, *Premnotrypes* spp., *Prostephanus truncatus*, *Psylliodes* spp., *Ptinus* spp., *Rhizobius ventralis*, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus* spp., *Sitophilus oryzae*, *Sphenophorus* spp., *Stegobium paniceum*, *Sternechus* spp., *Symphyletes* spp., *Tanymecus* spp., *Tenebrio molitor*, *Tenebrioides mauretanicus*, *Tribolium* spp., *Trogoderma* spp., *Tychius* spp., *Xylotrechus* spp., или *Zabrus* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Diptera, например *Aedes* spp., *Agromyza* spp., *Anastrepha* spp., *Anopheles* spp., *Asphondylia* spp., *Bactrocera* spp., *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Calliphora vicina*, *Ceratitis capitata*, *Chironomus* spp., *Chrysomyia* spp., *Chrysops* spp., *Chrysozona pluvialis*, *Cochliomyia* spp., *Contarinia* spp., *Cordylobia anthropophaga*, *Cricotopus sylvestris*, *Culex* spp., *Culicoides* spp., *Culiseta* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus oleae*, *Dasyneura* spp., *Delia* spp., *Dermatobia hominis*, *Drosophila* spp., *Echinocnemus* spp., *Fannia* spp., *Gasterophilus* spp., *Glossina* spp., *Haematopota* spp., *Hydrellia* spp., *Hydrellia griseola*, *Hylemya* spp., *Hippobosca* spp., *Hypoderma* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Lutzomyia* spp., *Mansonia* spp., *Musca* spp. (например, *Musca domestica*),

Oestrus spp., Oscinella frit, Paratanytarsus spp., Paralauterborniella subcineta, Pegomyia spp., Phlebotomus spp., Phorbia spp., Phormia spp., Piophilina casei, Prodiplosis spp., Psila rosae, Rhagoletis spp., Sarcophaga spp., Simulium spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tetanops spp., или Tipula spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Heteroptera, например Anasa tristis, Antestiopsis spp., Boisea spp., Blissus spp., Calocoris spp., Campylomma livida, Cavalerius spp., Cimex spp., Collaria spp., Creontiades dilutus, Dasynus piperis, Dichelops furcatus, Diconocoris hewetti, Dysdercus spp., Euschistus spp., Eurygaster spp., Heliopeltis spp., Horcias nobilellus, Leptocorisa spp., Leptocorisa varicornis, Leptoglossus phyllopus, Lygus spp., Macropes excavatus, Miridae, Monalonion atratum, Nezara spp., Oebalus spp., Pentomidae, Piesma quadrata, Piezodorus spp., Psallus spp., Pseudacysta perseae, Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scaptocoris castanea, Scotinophora spp., Stephanitis nashi, Tibraca spp., или Triatoma spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Homiptera, например, Acizzia acaciaebaileyanae, Acizzia dodonaeae, Acizzia uncatoides, Acrida turrata, Acyrthosipon spp., Acrogonia spp., Aeneolamia spp., Agonosцена spp., Aleyrodes proletella, Aleurolobus barodensis, Aleurothrixus floccosus, Allocaridara malayensis, Amrasca spp., Anuraphis cardui, Aonidiella spp., Aphanostigma pini, Aphis spp. (например, Aphis gossypii), Arboridia apicalis, Arytainilla spp., Aspidiella spp., Aspidiotus spp., Atanus spp., Aulacorthum solani, Bemisia tabaci, Blastopsylla occidentalis, Boreioglycaspis melaleucae, Brachycaudus helichrysi, Brachycolus spp., Brevicoryne brassicae, Cacopsylla spp., Calligypona marginata, Carneiocephala fulgida, Ceratovacuna lanigera, Cercopidae, Ceroplastes spp., Chaetosiphon fragaefolii, Chionaspis tegalensis, Chlorita onukii, Chondracris rosea, Chromaphis juglandicola, Chrysomphalus ficus, Cicadulina mbila, Cocomytilus halli, Coccus spp., Cryptomyzus ribis, Cryptoneossa spp., Ctenarytaina spp., Dalbulus spp., Dialeurodes citri, Diaphorina citri, Diaspis spp., Drosicha spp., Dysaphis spp., Dysmicoccus spp., Empoasca spp., Eriosoma spp., Erythroneura spp., Eucalyptolyma spp., Euphyllura spp., Euscelis bilobatus, Ferrisia spp., Geococcus coffeae, Glycaspis spp., Heteropsylla cubana, Heteropsylla spinulosa, Homalodisca coagulata, Homalodisca vitripennis, Hyalopterus arundinis, Icerya spp., Idiocerus spp., Idioscopus spp., Laodelphax striatellus, Lecanium spp., Lepidosaphes spp., Lipaphis erysimi, Macrosiphum spp., Macrosteles facifrons, Mahanarva spp., Melanaphis sacchari, Metcalfiella spp., Metopolophium dirhodum, Monellia costalis, Monelliopsis pecanis, Myzus spp., Nasonovia ribisnigri, Nephrotettix spp., Nettigoniclla spectra, Nilaparvata lugens, Oncometopia spp., Orthezia praelonga, Oxya chinensis, Pachyipsylla spp., Parabemisia myricae, Paratrioza spp., Parlatoria spp., Pemphigus spp., Pentatomidae spp. (например, Halyomorpha halys), Peregrinus maidis, Phenacoccus spp., Phloeomyzus passerinii, Phorodon humuli, Phylloxera spp., Pinnaspis aspidistrae, Planococcus spp., Prosopidopsylla flava, Protopulvinaria pyriformis, Pseudaulacaspis pentagona, Pseudococcus spp., Psyllopsis spp., Psylla spp., Pteromalus spp., Pyrilla spp., Quadraspidotus spp., Quesada gigas, Rastrococcus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus titanus, Schizaphis graminum,

Selenaspidus articulatus, *Sogata* spp., *Sogatella furcifera*, *Sogatodes* spp., *Stictocephala festina*, *Siphoninus phillyreae*, *Tenalaphara malayensis*, *Tetragonocephala* spp., *Tinocallis caryaefoliae*, *Tomaspis* spp., *Toxoptera* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza* spp., *Typhlocyba* spp., *Unaspis* spp., *Viteus vitifolii*, *Zygina* spp.;

к отряду *Hymenoptera*, например *Acromyrmex* spp., *Athalia* spp., *Atta* spp., *Diprion* spp., *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Sirex* spp., *Solenopsis invicta*, *Tapinoma* spp., *Urocerus* spp., *Vespa* spp., или *Xeris* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду *Isopoda*, например *Armadillidium vulgare*, *Oniscus asellus*, или *Porcellio scaber*.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду *Isoptera*, например *Coptotermes* spp., *Cornitermes cumulans*, *Cryptotermes* spp., *Incisitermes* spp., *Microtermes obesi*, *Odontotermes* spp., или *Reticulitermes* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду *Lepidoptera*, например *Achroia grisella*, *Acronicta major*, *Adoxophyes* spp., *Aedia leucomelas*, *Agrotis* spp., *Alabama* spp., *Amyeloides transitella*, *Anarsia* spp., *Anticarsia* spp., *Argyroplote* spp., *Barathra brassicae*, *Borbo cinnara*, *Bucculatrix thurberiella*, *Bupalus piniarius*, *Busseola* spp., *Cacoecia* spp., *Caloptilia theivora*, *Capua reticulana*, *Carpocapsa pomonella*, *Carposina niponensis*, *Cheimatobia brumata*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocerus* spp., *Cnaphalocrocis medinalis*, *Cnephasia* spp., *Conopomorpha* spp., *Conotrachelus* spp., *Copitarsia* spp., *Cydia* spp., *Dalaca noctuides*, *Diaphania* spp., *Diatraea saccharalis*, *Earias* spp., *Ecdytolopha aurantium*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Eldana saccharina*, *Ephestia* spp., *Epinotia* spp., *Epiphyas postvittana*, *Etiella* spp., *Eulia* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Galleria mellonella*, *Gracillaria* spp., *Grapholitha* spp., *Hedylepta* spp., *Helicoverpa* spp., *Heliopsis* spp., *Hofmannophila pseudospretella*, *Homoeosoma* spp., *Homona* spp., *Hyponomeuta padella*, *Kakivoria flavofasciata*, *Laphygma* spp., *Laspeyresia molesta*, *Leucinodes orbonalis*, *Leucoptera* spp., *Lithocolletis* spp., *Lithophane antennata*, *Lobesia* spp., *Loxagrotis albicosta*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma neustria*, *Maruca testulalis*, *Mamstra brassicae*, *Melanitis leda*, *Mocis* spp., *Monopis obviella*, *Mythimna separata*, *Nemapogon cloacellus*, *Nymphula* spp., *Oiketis* spp., *Oria* spp., *Orthaga* spp., *Ostrinia* spp., *Oulema oryzae*, *Panolis flammea*, *Parnara* spp., *Pectinophora* spp., *Perileucoptera* spp., *Phthorimaea* spp., *Phyllocnistis citrella*, *Phyllonorycter* spp., *Pieris* spp., *Platynota stultana*, *Plodia interpunctella*, *Plusia* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Prodenia* spp., *Protoparce* spp., *Pseudaletia* spp., *Pseudaletia unipuncta*, *Pseudoplusia includens*, *Pyrausta nubilalis*, *Rachiplusia nu*, *Schoenobius* spp., *Scirpophaga* spp., *Scirpophaga innotata*, *Scotia segetum*, *Sesamia* spp., *Sesamia inferens*, *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Spodoptera praefica*, *Stathmopoda* spp., *Stomopteryx subsecivella*, *Synanthedon* spp., *Tecia solanivora*, *Thermesia gemmatalis*, *Tinea cloacella*, *Tinea pellionella*, *Tineola bisselliella*, *Tortrix* spp., *Trichophaga tapetzella*, *Trichoplusia* spp., *Tryporyza incertulas*, *Tuta absoluta*, или *Virachola* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду *Orthoptera* или *Saltatoria*, например *Acheta domesticus*, *Dichroplus* spp., *Gryllotalpa* spp., *Hieroglyphus* spp., *Locusta*

spp., *Melanoplus* spp., или *Schistocerca gregaria*.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Phthiraptera, например *Damalinea* spp., *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Ptirus pubis*, *Trichodectes* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Psocoptera, например *Lepinatus* spp., или *Liposcelis* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Siphonaptera, например *Ceratophyllus* spp., *Ctenocephalides* spp., *Pulex irritans*, *Tunga penetrans*, или *Xenopsylla cheopsis*.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Thysanoptera, например *Anaphothrips obscurus*, *Baliothrips biformis*, *Drepanothrips reuteri*, *Enneothrips flavens*, *Frankliniella* spp., *Heliothrips* spp., *Hercinothrips femoralis*, *Rhipiphorothrips cruentatus*, *Scirtothrips* spp., *Taeniothrips cardamomi*, или *Thrips* spp.

В некоторых случаях насекомое относится к отряду Zygentoma (=Thysanura), например, *Ctenolepisma* spp., *Lepisma saccharina*, *Lepismodes inquilinus*, или *Thermobia domestica*.

В некоторых случаях насекомое относится к классу Symphyla, например, *Scutigereella* spp.

В некоторых случаях насекомое является микроскопическим клещом, включая без ограничения клещей Tarsonemid, таких как *Phytonemus pallidus*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Tarsonemus bilobatus* или им подобные; клещей Eupodid, таких как *Penthaleus erythrocephalus*, *Penthaleus major* или им подобные; паутиных клещиков, таких как *Oligonychus shinkajii*, *Panonychus citri*, *Panonychus mori*, *Panonychus ulmi*, *Tetranychus kanzawai*, *Tetranychus urticae* или им подобные; клещей Eriophyid, таких как *Acarphylla theavagrans*, *Aceria tulipae*, *Aculops lycopersici*, *Aculops pelekassi*, *Aculus schlechtendali*, *Eriophyes chibaensis*, *Phyllocoptruta oleivora* или им подобные; клещей Acarid, таких как *Rhizoglyphus robini*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Tyrophagus similis* или им подобные; клещей распада, таких как *Varroa jacobsoni*, *Varroa destructor* или им подобные; иксодовых клещей, таких как *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis campanulata*, *Ixodes ovatus*, *Ixodes persulcatus*, *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp. или им подобные; Cheyletidae, таких как *Cheyletiella yasguri*, *Cheyletiella blakei* или им подобные; Demodicidae, таких как *Demodex canis*, *Demodex cati* или им подобные; Psoroptidae, таких как *Psoroptes ovis* или им подобные; Sarcoptidae, таких как *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*, *Knemidocoptes* spp. или им подобные.

В таблице 8 представлены дополнительные примеры насекомых, которые вызывают заражения, которые могут быть подвергнуты лечению или предупреждению посредством композиций на основе РМР и соответствующих способов, описанных в данном документе.

Таблица 8. Насекомые-вредители

Обычное название	Латинское название
Мотылек кукурузный	<i>Ostrinia nubilalis</i>
Совка кукурузная	<i>Helicoverpa zea</i>
Совка малая	<i>Spodoptera exigua</i>
Совка травяная	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Огневка кукурузная юго-западная	<i>Diatraea grandiosella</i>
Огневка кукурузная малая	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>
Огневка стеблевая	<i>Paraipema nebris</i>
Совка луговая	<i>Pseudaletia unipuncta</i>
Совка-ипсилон	<i>Agrotis ipsilon</i>
Западная бобовая совка	<i>Striacosta albicosta</i>
Желто-полосатая совка луговая	<i>Spodoptera ornithogalli</i>
Западная желто-полосатая совка луговая	<i>Spodoptera praefica</i>
Южная совка луговая	<i>Spodoptera eridania</i>
Южная совка луговая	<i>Spodoptera eridania</i>
Совка маргаритковая	<i>Peridroma saucia</i>
Огневка стеблевая	<i>Paraipema nebris</i>
Совка капустная	<i>Trichoplusia ni</i>
Томатная острица	<i>Keiferia lycopersicella</i>
Бражник табачный	<i>Manduca sexta</i>
Помидорный бражник	<i>Manduca quinquemaculata</i>
Репница	<i>Artogeia rapae</i>
Белянка капустная	<i>Pieris brassicae</i>
Совка капустная	<i>Trichoplusia ni</i>
Капустная моль	<i>Plutella xylostella</i>
Совка малая	<i>Spodoptera exigua</i>
Совка обычная	<i>Agrotis segetum</i>
Личинка выемчатокрылой моли	<i>Phthorimaea operculella</i>
Капустная моль	<i>Plutella xylostella</i>
Совка сахарного тростника	<i>Diatraea saccharalis</i>
Зеркальная совка	<i>Crymodes devastator</i>
Тускляя совка	<i>Feltia ducens</i>
Глинистая совка	<i>Agrotis gladiaria</i>
Совка клеверная	<i>Plathypena scabra</i>

Соевая совка	<i>Pseudoplusia includes</i>
Совка бархатных бобов	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Блошка длинноусая	<i>Coleoptera Diabrotica barberi</i>
Блошка 11-точечная Говарда	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Западный кукурузный жук	<i>Diabrotica virgifera</i>
Кукурузный долгоносик	<i>Sitophilus zeamais</i>
Колорадский жук	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Жук-блошка шершавая	<i>Epitrix hirtipennis</i>
Блошка крестоцветная	<i>Phyllotreta cruciferae</i>
Жук-блошка черная	<i>Phyllotreta pusilla</i>
Перечный долгоносик	<i>Anthonomus eugenii</i>
Колорадский жук	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Блошка картофельная	<i>Epitrix cucumeris</i>
Проволочник <i>Melanotus</i> spp.	<i>Hemicrepidus memnonius</i>
Проволочники	<i>Ceutorhynchus assimilis</i>
Рапсовый семенной скрытнохоботник	<i>Phyllotreta cruciferae</i>
Блошка крестоцветная	<i>Melanolus</i> spp.
Проволочник	<i>Aeolus mellillus</i>
Личинка шелкона пшеничного	<i>Aeolus mancus</i>
Песочный проволочник	<i>Horistonotus uhlerii</i>
Долгоносик кукурузный	<i>Sphenophorus maidis</i>
Долгоносик тимофеевки	<i>Sphenophorus zeaе</i>
Долгоносик мятлика	<i>Sphenophorus parvulus</i>
Южный долгоносик кукурузы	<i>Sphenophorus callosus</i>
Личинки хруща	<i>Phyllophaga</i> spp.
Жук-блошка кукурузы	<i>Chaetocnema pulicaria</i>
Японский жук	<i>Popillia japonica</i>
Жук мексиканских бобов	<i>Epilachna varivestis</i>
Жук листьев бобов	<i>Cerotoma trifurcate</i>
Шпанские мушки	<i>Epicauta pestifera</i> <i>Epicauta lemniscata</i>
Тля кукурузная листовая	<i>Homoptera Rhopalosiphum maidis</i>
Тля кукурузная корневая	<i>Anuraphis maidiradicis</i>
Тля персиковая зеленая	<i>Myzus persicae</i>

Тля картофельная листовая	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>
Белокрылка тепличная	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
Белокрылка батата	<i>Bemisia tabaci</i>
Белокрылка недотроги двухцветковой	<i>Bemisia argentifolii</i>
Тля капустная	<i>Brevicoryne brassicae</i>
Тля персиковая зеленая	<i>Myzus persicae</i>
Цикадка картофельная	<i>Empoasca fabae</i>
Листоблошка Кокерелля	<i>Paratrioza cockerelli</i>
Белокрылка недотроги двухцветковой	<i>Bemisia argentifolii</i>
Белокрылка батата	<i>Bemisia tabaci</i>
Тля морковная	<i>Cavariella aegopodii</i>
Тля капустная	<i>Brevicoryne brassicae</i>
Американская носатка	<i>Saccharosydne saccharivora</i>
Тля желтая сахарного тростника	<i>Sipha flava</i>
Кузнечик трехугольной люцерны	<i>Spissistilus festinus</i>
<i>Lygus Hesperus</i>	<i>Hemiptera Lygus lineolaris</i>
Слепняк	<i>Lygus rugulipennis</i>
Щитник	<i>Acrosternum hilare</i>
Коричневый пронизывающий жук	<i>Euschistus servus</i>
Клоп-черепашка	<i>Blissus leucopterus leucopterus</i>
Листовой минер	<i>Diptera Liriomyza trifolii</i>
Листовой минер овощей	<i>Liriomyza sativae</i>
Листовой минер томата	<i>Scrobipalpa absoluta</i>
Личинка семян кукурузы	<i>Delia platura</i>
Личинка капусты	<i>Delia brassicae</i>
Муха капустная весенняя	<i>Delia radicum</i>
Муха морковная	<i>Psilia rosae</i>
Личинка корней сахарного тростника	<i>Tetanops myopaeformis</i>
Кобылка отличительная	<i>Orthoptera Melanoplus differentialis</i>
Краснобедрая кобылка	<i>Melanoplus femurrubrum</i>
Полосатая кобылка	<i>Melanoplus bivittatus</i>

iv. Моллюски

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности моллюска, например, для предупреждения или лечения

заражения, вызываемого моллюском, у растения. Термин "моллюск" включает любой организм, принадлежащий к типу Mollusca. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к моллюску путем приведения в контакт моллюска с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку биопестицида по отношению к растению с риском заражения, вызываемого моллюском, или зараженному им, путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы являются пригодными для предупреждения или лечения заражения, вызываемого наземными брюхоногими моллюсками (например, слизнями и улитками), в сельском хозяйстве и садоводстве. Они включают всех наземных слизней и улиток, которые главным образом встречаются в качестве многоядных вредителей на сельскохозяйственных и плодовых культурах. Например, моллюск может принадлежать к семейству Achatinidae, Agriolimacidae, Ampullariidae, Arionidae, Bradybaenidae, Helicidae, Hydromiidae, Lymnaeidae, Milacidae, Urocyclidae или Veronicellidae.

Например, в некоторых случаях моллюск представляет собой *Achatina* spp., *Archachatina* spp. (например, *Archachatina marginata*), *Agriolimax* spp., *Arion* spp. (например, *A. ater*, *A. circumscriptus*, *A. distinctus*, *A. fasciatus*, *A. hortensis*, *A. intermedius*, *A. rufus*, *A. subfuscus*, *A. silvaticus*, *A. lusitanicus*), *Arliomax* spp. (например, *Ariolimax columbianus*), *Biomphalaria* spp., *Bradybaena* spp. (например, *B. fruticum*), *Bulinus* spp., *Cantareus* spp. (например, *C. asperses*), *Cerata* spp. (например, *C. hortensis*, *C. nemoralis*, *C. hortensis*), *Cerata* spp., *Cochlicella* spp., *Cochlodina* spp. (например, *C. laminata*), *Deroceras* spp. (например, *D. agrestis*, *D. empiricorum*, *D. laeve*, *D. panorminum*, *D. reticulatum*), *Discus* spp. (например, *D. rotundatus*), *Euomphalia* spp., *Galba* spp. (например, *G. trunculata*), *Helicella* spp. (например, *H. itala*, *H. obvia*), *Helicigona* spp. (например, *H. arbustorum*), *Helicodiscus* spp., *Helix* spp. (например, *H. aperta*, *H. aspersa*, *H. pomatia*), *Limax* spp. (например, *L. cinereoniger*, *L. flavus*, *L. marginatus*, *L. maximus*, *L. tenellus*), *Limicolaria* spp. (например, *Limicolaria aurora*), *Lymnaea* spp. (например, *L. stagnalis*), *Mesodon* spp. (например, *Meson thyroidus*), *Monadenia* spp. (например, *Monadenia fidelis*), *Milax* spp. (например, *M. gagates*, *M. marginatus*, *M. sowerbyi*, *M. budapestensis*), *Oncomelania* spp., *Neohelix* spp. (например, *Neohelix albolabris*), *Operas* spp., *Otala* spp. (например, *Otala lacteal*), *Oxyloma* spp. (например, *O. pfeifferi*), *Pomacea* spp. (например, *P. canaliculata*), *Succinea* spp., *Tandonia* spp. (например, *T. budapestensis*, *T. sowerbyi*), *Theba* spp., *Vallonia* spp., или *Zonitoides* spp. (например, *Z. nitidus*).

v. Нематоды

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности нематоды, например, для предупреждения или лечения заражения, вызываемого нематодой, у растения. Термин "нематода" включает любой организм, принадлежащий к типу Nematoda. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к нематоде путем приведения в контакт нематоды с

композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку биопестицида по отношению к растению с риском заражения, вызываемого нематодой, или зараженному ей, путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения заражения нематодами, которые вызывают повреждение растений, в том числе, например, *Meloidogyne* spp. (корневой нарост), *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Ditylenchus dipsaci*, *Rotylenchulus reniformis*, *Xiphinema* spp., *Aphelenchoides* spp. и *Belonolaimus longicaudatus*. В некоторых случаях нематода представляет собой паразитическую нематоду растения или нематоду, обитающую в почве. Паразитические нематоды растений включают без ограничения эктопаразитов, таких как *Xiphinema* spp., *Longidorus* spp. и *Trichodorus* spp.; полупаразитов, таких как *Tylenchulus* spp.; мигрирующих эндопаразитов, таких как *Pratylenchus* spp., *Radopholus* spp. и *Scutellonema* spp.; прикрепленных паразитов, таких как *Heterodera* spp., *Globodera* spp. и *Meloidogyne* spp., а также эндопаразитов стеблей и листьев, таких как *Ditylenchus* spp., *Aphelenchoides* spp. и *Hirshmaniella* spp. Особенно вредными корневыми паразитическими почвенными нематодами являются такие как цистообразующие нематоды родов *Heterodera* или *Globodera* и/или клубеньковые нематоды рода *Meloidogyne*. Вредоносными видами из этих родов являются, например, *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* (соевая цистообразующая нематода), *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis* (картофельная цистообразующая нематода), но все эти виды эффективно контролируются посредством композиций на основе РМР, описанных в данном документе. Однако применение композиций на основе РМР, описанных в данном документе, ни в коем случае не ограничено этими родами или видами, но и также в равной степени распространяется на других нематод.

Другие примеры нематод, на которые можно целенаправленно воздействовать посредством способов и композиций, описанных в данном документе, включают без ограничения, например *Aglenchus agricola*, *Anguina tritici*, *Aphelenchoides arachidis*, *Aphelenchoides fragaria* и эндопаразитов стеблей и листьев *Aphelenchoides* spp. в целом, *Belonolaimus gracilis*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Belonolaimus nortoni*, *Bursaphelenchus cocophilus*, *Bursaphelenchus eremus*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bursaphelenchus mucronatus*, и *Bursaphelenchus* spp. в целом, *Sacopaurus pestis*, *Criconemella curvata*, *Criconemella onoensis*, *Criconemella ornata*, *Criconemella rusium*, *Criconemella xenoplax* (= *Mesocriconema xenoplax*) и *Criconemella* spp. в целом, *Criconemoides femiae*, *Criconemoides onoense*, *Criconemoides ornatum* и *Criconemoides* spp. в целом, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus myceliophagus* и эндопаразитов стеблей и листьев *Ditylenchus* spp. в целом, *Dolichodorus heterocephalus*, *Globodera pallida* (= *Heterodera pallida*), *Globodera rostochiensis* (картофельную цистообразующую нематоду), *Globodera solanacearum*, *Globodera tabacum*, *Globodera virginia* и неподвижных

цистообразующих паразитов *Globodera* spp. в целом, *Helicotylenchus digonicus*, *Helicotylenchus dihystra*, *Helicotylenchus erythrinae*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Helicotylenchus nannus*, *Helicotylenchus pseudorobustus* и *Helicotylenchus* spp. в целом, *Hemicriciconemoides*, *Hemicycliophora arenaria*, *Hemicycliophora nudata*, *Hemicycliophora parvana*, *Heterodera avenae*, *Heterodera cruciferae*, *Heterodera glycines* (соевую цистообразующую нематоду), *Heterodera oryzae*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera zeaе* и неподвижных цистообразующих паразитов *Heterodera* spp. в целом, *Hirschmaniella gracilis*, *Hirschmaniella oryzae* *Hirschmaniella spinicaudata* и эндопаразитов стеблей и листьев *Hirschmaniella* spp. в целом, *Hoplolaimus aegyptii*, *Hoplolaimus californicus*, *Hoplolaimus columbus*, *Hoplolaimus galeatus*, *Hoplolaimus indicus*, *Hoplolaimus magnistylus*, *Hoplolaimus pararobustus*, *Longidorus africanus*, *Longidorus breviannulatus*, *Longidorus elongatus*, *Longidorus laevicapitatus*, *Longidorus vineacola* и эктопаразитов *Longidorus* spp. в целом, *Meloidogyne acronea*, *Meloidogyne africana*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne arenaria thamesi*, *Meloidogyne artiella*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne coffeicola*, *Meloidogyne ethiopica*, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne fallax*, *Meloidogyne graminicola*, *Meloidogyne graminis*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne incognita acrita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne kikuyensis*, *Meloidogyne minor*, *Meloidogyne naasi*, *Meloidogyne paranaensis*, *Meloidogyne thamesi* и неподвижных паразитов *Meloidogyne* spp. в целом, *Meloinema* spp., *Nacobbus aberrans*, *Neotylenchus vigissi*, *Paraphelenchus pseudoparietinus*, *Paratrichodorus allius*, *Paratrichodorus lobatus*, *Paratrichodorus minor*, *Paratrichodorus nanus*, *Paratrichodorus porosus*, *Paratrichodorus teres* и *Paratrichodorus* spp. в целом, *Paratylenchus hamatus*, *Paratylenchus minutus*, *Paratylenchus projectus* и *Paratylenchus* spp. в целом, *Pratylenchus agilis*, *Pratylenchus allenii*, *Pratylenchus andinus*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus cerealis*, *Pratylenchus coffeae*, *Pratylenchus crenatus*, *Pratylenchus delattrei*, *Pratylenchus giubbicaudatus*, *Pratylenchus goodeyi*, *Pratylenchus hamatus*, *Pratylenchus hexincisus*, *Pratylenchus loosi*, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus pratensis*, *Pratylenchus scribneri*, *Pratylenchus teres*, *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus vulnus*, *Pratylenchus zeaе* и мигрирующих эндопаразитов *Pratylenchus* spp. в целом, *Pseudohalenchus minutus*, *Psilenchus magnidens*, *Psilenchus tumidus*, *Punctodera chaltoensis*, *Quinisulcius acutus*, *Radopholus citrophilus*, *Radopholus similis*, мигрирующих эндопаразитов *Radopholus* spp. в целом, *Rotylenchulus borealis*, *Rotylenchulus parvus*, *Rotylenchulus reniformis* и *Rotylenchulus* spp. в целом, *Rotylenchus laurentinus*, *Rotylenchus macrodoratus*, *Rotylenchus robustus*, *Rotylenchus uniformis* и *Rotylenchus* spp. в целом, *Scutellonema brachyurum*, *Scutellonema bradys*, *Scutellonema clathricaudatum* и мигрирующих эндопаразитов *Scutellonema* spp. в целом, *Subanguina radiciola*, *Tetylenchus nicotianaе*, *Trichodorus cylindricus*, *Trichodorus minor*, *Trichodorus primitivus*, *Trichodorus proximus*, *Trichodorus similis*, *Trichodorus sparsus* и эктопаразитов *Trichodorus* spp. в целом, *Tylenchorhynchus agri*, *Tylenchorhynchus brassicae*, *Tylenchorhynchus clarus*, *Tylenchorhynchus claytoni*, *Tylenchorhynchus digitatus*, *Tylenchorhynchus ebriensis*, *Tylenchorhynchus maximus*, *Tylenchorhynchus nudus*, *Tylenchorhynchus vulgaris* и

Tylenchorhynchus spp. в целом, Tylenchulus semipenetrans и полупаразитов Tylenchulus spp. в целом, Xiphinema americanum, Xiphinema brevicolle, Xiphinema dimorphicaudatum, Xiphinema index и эктопаразитов Xiphinema spp. в целом.

Другие примеры нематод-вредителей включают виды, принадлежащие к семейству Criconematidae, Belonolaimidae, Hoploaimidae, Heteroderidae, Longidoridae, Pratylenchidae, Trichodoridae, или Anguinidae.

В таблице 9 представлены дополнительные примеры нематод и ассоциированных с ними заболеваний, которые можно лечить или предупреждать с использованием композиций на основе РМР и соответствующих способов, описанных в данном документе.

Таблица 9. Нематоды-вредители

Заболевание	Возбудитель
Шиловидное образование	Dolichoderus spp., D. heterocephalus
Луковица и стебель (европейский)	Ditylenchus dipsaci
Образование ходов	Radopholus similes R. similis
Циста	Heterodera avenae, H. zeaе, H. schachtii; Globodera rostochiensis, <i>G.pallida</i> , u <i>G. tabacum</i> ; Heterodera trifolii, H. medicaginis, H. ciceri, H. mediterranea, H. cyperi, H. salixophila, H. zeaе, H.goettingiana, H. riparia, H. humuli, H. latipons, H. sorghi, H. fici, H.litoralis, u H. turcomanica; Punctodera chalcoensis
Зубчатость	Xiphinema spp., X. americanum, X. Mediterraneum
Ненастоящий корневой нарост	Nacobbus dorsalis
Копьевидное образование	Hoplolaimus spp., H. galeatus
Копьевидное образование, Колумбия	Hoplolaimus Columbus
Повреждение	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. coffeae P. crenatus, P.hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. magnica, P. neglectus, P. thornei, P. vulnus, P. zeaе
Игольчатое образование	Longidorus spp., L. breviannulatus
Другие	Hirschmanniella species, Pratylenchoid

	magnicauda
Кольцевое образование	Criconemella spp., C. ornata
Коневой нарост	Meloidogyne spp., M. arenaria, M. chitwoodi, M. artiellia, M. fallax, M. hapla, M. javanica, M. incognita, M. microtyla, M. partityla, M. panyuensis, M. paranaensis
Спиральное образование	Helicotylenchus spp.
Кольцевое образование	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
Щетинистый корнеплод	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisolcius acutus, Trichodorus spp.
Остановка роста	Tylenchorhynchus dubius

vi. Вирусы

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности вируса, например, для предупреждения или лечения вирусной инфекции у растения. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к вирусу путем приведения в контакт вируса с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают доставку композиции на основе РМР растению с риском заражения вирусной инфекцией или имеющему ее путем приведения растения в контакт с композицией на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы являются пригодными для доставки вирусу, который вызывает вирусные заболевания у растений, в том числе вирусы и заболевания, перечисленные в таблице 10.

Таблица 10. Вирусные патогены растений

Заболевание	Возбудитель
Альфамовирусы:	альфамовирус мозаики люцерны
Bromoviridae	
Альфакриптовирuсы:	альфакриптовирuс 1 люцерны, альфакриптовирuс 1 свеклы, альфакриптовирuс 2
Partitiviridae	свеклы, альфакриптовирuс 3 свеклы, альфакриптовирuс 1
	гвоздики, умеренный альфакриптовирuс 1 моркови, умеренный
	альфакриптовирuс 3 моркови, умеренный альфакриптовирuс 4 моркови,

	альфакриптовирус ежи сборной, альфакриптовирус 1 трилистника, альфакриптовирус
	3 трилистника, альфакриптовирус редиса с желтым краем,
	альфаакриптовирус райграсса, умеренный альфакриптовирус шпината,
	альфакриптовирус <i>Vicia</i> , альфакриптовирус 1 белого клевера, альфакриптовирус
	3 белого клевера
Баднавирусы	баднавирус полосатости банана, баднавирус деформации побегов <i>Sasa</i> , баднавирус
	желтой пятнистости <i>Canna</i> , баднавирус желтой пятнистости <i>Commelina</i> ,
	бацилоформный баднавирус <i>Dioscorea</i> , баднавирус пятнистости макушки
	каланхоэ, бацилоформный баднавирус риса тунгро, баднавирус кольцевой пятнистости
	<i>Schefflera</i> , бацилоформный баднавирус сахарного тростника
Бетакриптовирусы:	умеренный бетакриптовирус 2 моркови, бетакриптовирус 2 трилистника,
<i>Partitiviridae</i>	бетакриптовирус 2 красного клевера, бетакриптовирус 2 белого клевера
Бигеминивирусы:	бигеминивирус мозаики <i>Abutilon</i> , бигеминивирус желтых прожилок
<i>Geminiviridae</i>	<i>Ageratum</i> , бигеминивирус мозаики калико бобов, бигеминивирус золотой мозаики
	бобов, бигеминивирус желтой прожилковой мозаики <i>Bhendi</i> ,
	бигеминивирус мозаики африканского маниока, бигеминивирус мозаики индийского
	маниока, бигеминивирус <i>Chino del Tomate</i> , бигеминивирус складчатости листьев
	хлопчатника, бигеминивирус курчавости листьев хлопчатника, бигеминивирус желтой прожилковой
	мозаики кротона, бигеминивирус желтой мозаики <i>Dolichos</i> ,
	бигеминивирус мозаики <i>Euphorbia</i> , бигеминивирус желтой

	мозаики
	долихоса двухцветкового, бигеминивирус мозаики <i>Jatropha</i> , бигеминивирус золотистой мозаики
	лимской фасоли, бигеминивирус курчавости листьев дыни, бигеминивирус желтой
	мозаики золотистой фасоли, бигеминивирус курчавости листьев окры, бигеминивирус
	перца <i>Hausteco</i> , бигеминивирус перца <i>Texas</i> , бигеминивирус желтой
	мозаики картофеля, бигеминивирус мозаики <i>Rhynchosia</i> , бигеминивирус
	золотистой мозаики <i>Serrano</i> , бигеминивирус курчавости листьев патиссона,
	бигеминивирус курчавости листьев табака, бигеминивирус курчавости листьев австралийского
	томата, бигеминивирус золотой мозаики томата, бигеминивирус
	курчавости листьев индийского томата, бигеминивирус складчатости листьев томата,
	бигеминивирус пятнистости томата, бигеминивирус желтой курчавости листьев
	томата, бигеминивирус желтой мозаики томата, бигеминивирус
	хлоротической остановки роста арбуза, бигеминивирус курчавости и пятнистости
	арбуза
Бромовирусы:	бромовирус пятнистости кормовых бобов, бромовирус мозаики <i>Brome</i> , бромовирус
<i>Bromoviridae</i>	желтой крапчатости <i>Cassia</i> , бромовирус хлоротической крапчатости вигны,
	бромовирус желтой пятнистости <i>Melandrium</i> , латентный бромовирус
	клеитонии
Бимовирусы:	бимовирус легкой мозаики ячменя, бимовирус желтой мозаики

	ячменя,
Potyviridae	бимовирус мозаики овса, бимовирус некротической мозаики риса, бимовирус
	веретеновидной полосатой мозаики пшеницы, бимовирус желтой мозаики пшеницы
Капилловирусы	капилловирус желобления ствола яблони, капилловирус вишни А, капилловирус
	кольцевой пятнистости цитрусовых, капилловирус хлоротических листьев лилейных
Карлавирусы	карлавирус ожога голубики, карлавирус кактусовых 2, латентный
	карлавирус каперсов, латентный карлавирус гвоздики, карлавирус В
	Chrysanthemum, латентный карлавирус одуванчика, карлавирус бузины, карлавирус S
	фигового дерева, карлавирус S Helenium, латентный карлавирус жимолости,
	американский латентный карлавирус хмеля, латентный карлавирус хмеля, карлавирус мозаики
	хмеля, латентный карлавирус Kalanchoe, карлавирус крапчатости лилейных, бессимптомный
	карлавирус лилии, латентный карлавирус шелковицы, карлавирус
	некроза прожилок дыни мускатной, латентный карлавирус Nerine, латентный карлавирус
	Passiflora, карлавирус полосатости гороха, карлавирус мозаики тополя, карлавирус M
	картофеля, карлавирус S картофеля, карлавирус мозаики прожилок красного клевера,
	латентный карлавирус шалота, псевдолегкий карлавирус клубники с желтыми
	краями
Кармовирусы:	кармовирус легкой мозаики бобов, кармовирус хлоротической пятнистости

Tombusviridae	Cardamine, кармовирус крапчатости гвоздики, кармовирус пятнистости листьев
	огурца, кармовирус огурца, передающийся через почву, кармовирус мозаики
	Galinsoga, кармовирус хлоротической кольцевой пятнистости Hibiscus, кармовирус некротической
	пятнистости дыни, кармовирус полосатости цветков Pelargonium, кармовирус курчавости
	тюльпана
Каулимовирусы	каулимовирус красной кольцевой пятнистости голубики, каулимовирус выемчатых краев
	гвоздики, каулимовирус мозаики цветной капусты, каулимовирус мозаики
	Dahlia, каулимовирус мозаики норичника, латентный каулимовирус
	хрена, каулимовирус мозаики Mirabilis, каулимовирус хлоротических
	полосатости арахиса, каулимовирус хлоротической пятнистости сои, каулимовирус
	батата, каулимовирус пятнистости чертополоха
Клостеровирусы	клостеровирус желтого увядания свеклы, клостеровирус желтизны свеклы, клостеровирус
	тяжелого хлороза кормовых бобов, клостеровирус желтизны лопуха,
	клостеровирус некротической пятнистости гвоздики, клостеровирус увядания Citrus,
	клостеровирус желтизны клевера, клостеровирус, ассоциированный с пористостью стебля виноградной
	лозы, клостеровирус желтизны листьев пшеницы
Комовирусы:	комовирус крапчатости бобовых стручков, комовирус складчатой мозаики бобов, комовирус
Comoviridae	пятнистости кормовых бобов, комовирус истинной мозаики кормовых бобов, комовирус
	мозаики вигны, комовирус тяжелой мозаики вигны, комовирус

	мозаки глицинии, комовирус легкой мозаики гороха, комовирус андийской
	пятнистости картофеля, комовирус мозаики перепелиного гороха, комовирус мозаики
	редиса, комовирус крапчатости красного клевера, комовирус мозаики
	патиссона, комовирус C Ulucus
Кукумовирусы:	кукумовирус мозаики огурца, кукумовирус задержки роста арахиса, кукумовирус
Bromoviridae	аспермии томата
Циторабдовирусы:	циторабдовирус мозаики желтой полосатости ячменя, циторабдовирус желтых прожилок
Rhabdoviridae	кормовых бобов, циторабдовирус некротической желтизны брокколи,
	циторабдовирус северной мозаики злаковых, циторабдовирус полосатости листьев
	Festuca, циторабдовирус некротической желтизны латука,
	циторабдовирус Sonchus, циторабдовирус курчавости клубники
Диантоввирусы	диантоввирус кольцевых пятен гвоздики, диантоввирус некротической мозаики красного
	клевера, диантоввирус некротической мозаики сладкого клевера
Энамовирусы	энамовирус деформирующей мозаики гороха
Фидживирусы:	фидживирус тяжелой карликовости маиса, фидживирус стерильной карликовости овса, фидживирус
Reoviridae	задержки роста росички, фидживирус черной полосатой карликовости риса, фидживирус болезни
	сахарного тростника
Фуровирусы	фуровирус некротических желтых прожилок свеклы, фуровирус свеклы, передающийся через почву,
	фуровирус некроза кормовых бобов, фуровирус золотой полосатости овса, фуровирус
	скупенности арахиса, фуровирус метельчатости верхушки картофеля, фуровирус хлористой пятнистости

	Sorghum, фурувирус мозаики пшеницы, передающейся через почву
Хордейвирусы	латентный хордейвирус побледнения Anthoxanthum, хордейвирус мозаичной полосатости
	ячменя, хордейвирус кольцевой пятнистости Luchnis, полулатентный хордейвирус
	Poa
Гибригеминивирусы:	гибригеминивиринг курчавости верхушки свеклы, гибригеминивиринг псевдокурчавости верхушки
Geminiviridae	томата
Идеовирусы	Идеовирус кустистой карликовости малины
Иларвирусы:	иларвирус мозаики яблони, иларвирус 2 Asparagus, иларвирус некротического
Bromoviridae	шока голубики, иларвирус складчатости листьев цитруса, иларвирус мозаицизма
	Citrus, иларвирус крапчатости вяза, иларвирус Humulus japonicus,
	иларвирус мозаики Hydrangea, иларвирус кольцевой пятнистости лилейных, иларвирус
	крапчатости Parietaria, иларвирус сливы с паттерном американской разметки, иларвирус карликовости
	чернослива, иларвирус некротической кольцевой пятнистости Prunus, латентный иларвирус шпината,
	иларвирус полосатости табака, иларвирус мозаики яблони Tulare
Ипомовирусы:	ипомовирус легкой крапчатости батата, ипомовирус желтой карликовости
Potyviridae	батата
Лютеовирусы	лютеовирус желтой карликовости ячменя, лютеовирус скручивания листьев бобов, лютеовирус легкого
	пожелтения свеклы, западный лютеовирус пожелтения свеклы, лютеовирус покраснения
	листьев моркови, лютеовирус вспомогательных розеток земляного ореха, лютеовирус скручивания листьев

	картофеля, лютеовирус пожелтения Solanum, лютеовирус карликовости сои,
	индонезийский лютеовирус карликовости сои, лютеовирус легкой желтизны краев
	клубники, лютеовирус листьев красного подземного клевера, лютеовирус
	некротической карликовости табака
Махломовирусы	махломовирус хлоротической крапчатости маиса
Маклуравирусы	маклуравирус мозаики Maclura, латентный маклуравирус Narcissus
Марафивирусы	марафивирус выгравированной линии бермудской травы, марафивирус маиса gayado
	fino, марафивирус голубой карликовости овса
Моногеминивирусы:	моногеминивирус полосатой мозаики Chloris, моногеминивирус полосатой мозаики
Geminiviridae	Digitaria, моногеминивирус полосатости Digitaria, моногеминивирус полосатости
	маиса, моногеминивирус полосатости Miscanthus, моногеминивирус
	полосатости Panicum, моногеминивирус полосатой мозаики
	Paspalum, моногеминивирус полосатости сахарного тростника, моногеминивирус
	желтой карликовости табака, моногеминивирус карликовости пшеницы
Нанавирусы	нанавирус кустистости верхушки банана, нанавирус гниения листьев кокоса
	нанавирус некротической желтизны конских бобов, нанавирус карликовости астрагала,
	нанавирус остановки роста подземного клевера
Некривирусы	некривирус некроза табака, некривирус желтой полосатости гвоздики,
	некривирус некроза Lisianthus
Неповирусы:	неповирус мозаики Arabis, неповирус А аракачи, итальянский латентный

Comoviridae	неповирус артишока, неповирус желтой кольцевой пятнистости артишока, неповирус
	крапчатости листьев голубики, неповирус некроза Сасао, неповирус зеленой
	крапчатости маниока, неповирус скручивания листьев вишни, неповирус раздробленных листьев
	вишни, неповирус желтой крапчатости цикория, латентный неповирус клевера
	мясокрасного, неповирус некротической остановки роста Сусас, болгарский латентный
	неповирус виноградной лозы, неповирус хромовой мозаики виноградной лозы, неповирус
	короткоузлия виноградной лозы, латентный неповирус кольцевой пятнистости Hibiscus, австралийский
	латентный неповирус цюцерны, неповирус кольцевой пятнистости шелковицы,
	латентный неповирус кольцевой пятнистости миробалана, латентный неповирус кольцевой пятнистости
	оливы, неповирус мозаики розетов персика, неповирус черной кольцевой пятнистости
	картофеля, неповирус U картофеля, неповирус кольцевой пятнистости малины,
	неповирус кольцевой пятнистости табака, неповирус черной кольцевой пятнистости томата, неповирус
	кольцевой пятнистости томата
Нуклеорабдовирусы:	латентный нуклеорабдовирус моркови, нуклеорабдовирус перистых красных прожилок
Rhabdoviridae	кориандра, нуклеорабдовирус мозаики борщевика обыкновенного,
	нуклеорабдовирус хлоротической полосатости Cynodon, нуклеорабдовирус желтых прожилок
	Datura, нуклеорабдовирус крапчатой карликовости баклажана,
	нуклеорабдовирус мозаики маиса, нуклеорабдовирус желтых прожилок

	<i>Pittosporum</i> , нуклеорабдовирус желтой карликовости картофеля,
	нуклеорабдовирус желтой сети <i>Sonchus</i> , нуклеорабдовирус желтых прожилок
	осота, нуклеорабдовирус просветления жилок томата, американский
	нуклеорабдовирус полосатой мозаики пшеницы
Оризавирусы:	оризавирус неровной остановки роста <i>Echinochloa</i> , оризавирус неровной остановки роста риса
Reoviridae	
Оурмиавирусы	ивуарский бациллоформный оурмиавирус маниока, эфирский оурмиавирус
	вишни, оурмиавирус дыни <i>Ourmia</i> , оурмиавирус зональной пятнистости
	<i>Pelargonium</i>
Фитореовирусы:	фитореовирус раневой опухоли клевера, фитореовирус карликовости риса, фитореовирус
Reoviridae	галловой карликовости риса, фитореовирус кустистой остановки роста риса, фитореовирус
	батата
Потексвирусы	потексвирус 3 <i>Asparagus</i> , потексвирус X кактусовыха, потексвирус X
	маниока, потексвирус X цикория, потексвирус желтой мозаики
	клевера, потексвирус X <i>Commelina</i> , потексвирус мозаики
	<i>Cymbidium</i> , потексвирус X <i>Daphne</i> , потексвирус мозаики лисохвоста,
	потексвирус кольцевой пятнистости <i>Hydrangea</i> , потексвирус X лилии, потексвирус
	мозаики <i>Narcissus</i> , потексвирус X <i>Nerine</i> , потексвирус мозаики папайи,
	потексвирус мозаики пепино, потексвирус мозаики <i>Plantago asiatica</i> ,
	потексвирус X плантана, потексвирус мозаики <i>Potato aucuba</i> , потексвирус X

	картофеля, потексвирус X тюльпана, потексвирус крапчатости Viola, потексвирус
	мозаики белого клевера
Потивирусы:	потивирус мозаики Alstroemeria, потивирус крапчатости листьев Amaranthus,
Potyviridae	потивирус мозаики Araujia, потивирус Y аракачи, латентный потивирус
	артишока, потивирус I Asparagus, потивирус мозаики прилистников банана,
	потивирус обычного мозаичного некроза бобов, потивирус обычной мозаики
	бобов, потивирус желтой мозаики бобов, потивирус мозаики свеклы,
	потивирус мозаики Bidens, потивирус крапчатости Bidens, потивирус
	мозаики кардамона, потивирус крапчатости прожилок гвоздики, потивирус истончения листьев
	моркови, потивирус бурой полосатости маниока, потивирус желтой пятнистости
	Cassia, потивирус мозаики сельдерея, потивирус кустистой карликовости
	цикория, потивирус деформационной мозаики нута, потивирус желтизны
	прожилка клевера, потивирус Commelina diffusa, потивирус мозаики
	Commelina, потивирус зеленого окаймления жилок вигны, марокканский
	потивирус мозаики вигны, передаваемый через тлей, потивирус складчатой мозаики
	нута, потивирус мозаики Crinum, потивирус Y Daphne, потивирус
	мозаики колоказии, колумбийский потивирус Datura, потивирус деформационной
	мозаики Datura, потивирус некроза Datura, потивирус

	истонченности
	Datura, потивирус мозаики Dendrobium, потивирус мозаики
	Desmodium, потивирус Dioscorea alata, потивирус зеленой полосатой
	мозаики Dioscorea, потивирус зеленой мозаики баклажана, потивирус
	кольцевой пятнистости Euphorbia, потивирус мозаики Freesia, потивирус глазковой пятнистости
	земляного ореха, бессимптомный потивирус гуара, потивирус мозаики проса
	гвинейского, потивирус Y Helanium, потивирус мозаики белены,
	потивирус мозаики Hippeastrum, потивирус мозаики Hyacinth, потивирус
	мозаики Iris fulva, потивирус легкой мозаики Iris, потивирус тяжелой
	мозаики Iris, потивирус мозаики сорго алепского, потивирус Y
	Kennedya, потивирус желтой полосатости лука-пороя, потивирус мозаики латука,
	потивирус крапчатости лилии, потивирус карликовой мозаики маиса, потивирус просветления
	прожилок Malva, потивирус крапчатости календулы, потивирус желтой
	полосатости Narcissus, потивирус Nerine, потивирус желтой карликовости лука,
	потивирус мозаики Ornithogalum, потивирус кольцевой пятнистости папайи, потивирус
	мозаики пастернака, потивирус кольцевой пятнистости Passiflora, южно-африканский
	потивирус Passiflora, потивирус лесистости маракуйи, потивирус
	мозаики пачули, потивирус мозаики гороха, потивирус мозаики гороха, передаваемый через
	семена, потивирус зеленой мозаики арахиса, потивирус

	крапчатости арахиса,
	индийский потивирус крапчатости перца, потивирус крапчатости перца, потивирус
	тяжелой мозаики перца, потивирус прожилковой крапчатости перца, потивирус оспы
	сливы, потивирус мозаики лаконоса, потивирус А картофеля, потивирус
	V картофеля, потивирус Y картофеля, потивирус мозаики Primula,
	потивирус крапчатости Ranunculus, потивирус мозаики Sorghum, потивирус
	мозаики сои, потивирус Y гвоздичника, потивирус мозаики сахарного тростника,
	потивирус перистой крапчатости батата, потивирус G батата,
	потивирус деформационной мозаики канвалии мечевидной, потивирус мозаики
	тамарилло, потивирус мозаики Telfairia, потивирус гравировки табака,
	потивирус прожилковой мозаики табака, потивирус прожилковой крапчатости
	табака, потивирус вилта табака, перуанский потивирус томата,
	потивирус традескации Zebrina, потивирус 1 Tropaeolum,
	потивирус 2 Tropaeolum, потивирус туберозы, потивирус полосатой пестролепестности
	тюльпана, потивирус пестролепестности тюльпана, потивирус хлоротической бородавчатости
	тюльпана, потивирус мозаики турнепса, потивирус мозаики Ullucus,
	потивирус мозаики Vallota, потивирус мозаики ванили, потивирус
	некроза ванили, потивирус деформационной мозаики Voandzeia,
	потивирус 1 мозаики арбуза, потивирус 2 мозаики арбуза,
	потивирус мозаики ипомеи пучковатой, потивирус

	прожилковатой мозаики Wisteria, потивирус
	мозаики ямса, потивирус желтой пятнистости цуккини, потивирус желтой
	мозаики цуккини
Римовирусы:	римовирус мозаики Hordeum, римовирус некротической крапчатости
Potyviridae	
Римовирус мозаики	
пырея	овса, римовирус мозаики райграсса, римовирус полосатой мозаики
	пшеницы
Сателлитные РНК	сателлитная РНК мозаики Arabis, сателлитная РНК желтой крапчатости цикория,
	сателлитная РНК мозаики огурца, сателлитная РНК короткоузлости виноградной лозы,
	сателлитная РНК латентной кольцевой пятнистости клубники, сателлитная РНК кольцевой пятнистости
	табака, сателлитная РНК черной кольцевой пятнистости томата, сателлитная РНК бархатной
	крапчатости табака
Сателливирусы	сателливирус мозаики белой линии маиса, сателливирус мозаики Panicum,
	сателливирус мозаики табака, сателливирус некроза табака
Секвивирусы:	секвивирус желтой мозаики одуванчика, секвивирус желтой пятнистости
Sequiviridae	пастернака
Собемовирусы	южный собемовирус мозаики бобов, собемовирус истонченности
	голубики, собемовирус крапчатости ежи сборной, собемовирус переходной
	полосатости люцерны, собемовирус желтой крапчатости риса, собемовирус
	желтой крапчатости Rottboellia, собемовирус крапчатости
	Solanum nodiflorum, собемовирус мозаики мари стеной,

	собемовирус крапчатости
	подземного клевера, собемовирус розеток тюльпана, собемовирус бархатной
	крапчатости табака
Тенуивирусы	тенуивирус штриховатости маиса, тенуивирус травянистой низкорослости риса, тенуивирус риса
	hoja blanca, тенуивирус полосатости риса
Тобамовирусы	тобамовирус зеленой крапчатой мозаики огурца, тобамовирус мозаики
	красного жасмина, тобамовирус зеленой крапчатой мозаики Куури,
	тобамовирус кольцевой пятнистости Odontoglossum, тобамовирус легкой крапчатости
	паприки, тобамовирус легкой крапчатости перца, тобамовирус мозаики
	подорожника ланцетовидного, тобамовирус Sammons Opuntia, тобамовирус мозаики
	кроталеярии индийской, тобамовирус легкой зеленой мозаики табака, тобамовирус мозаики
	табака, тобамовирус мозаики томата, тобамовирус легкой
	крапчатости Ullucus
Тобравирусы	тобравирус раннего побурения гороха, тобравирус кольцевой пятнистости перца, тобравирус
	ломкости табака
Томбусвирусы:	томбусвирус крапчатой курчавости артишока, итальянский томбусвирус кольцевой пятнистости
Tombusviridae	гвоздики, томбусвирус некроза огурца, томбусвирус кольцевой пятнистости
	Cymbidium, томбусвирус крапчатой курчавости баклажана, алжирский латентный томбусвирус
	виноградной лозы, томбусвирус Lato River, томбусвирус Neckar
	River, томбусвирус курчавости листьев Pelargonium, марокканский томбусвирус

	перца, томбусвирус астероидной мозаики Petunia, томбусвирус кустистой
	карликовости томата
Тосповирусы:	тосповирус некротической пятнистости Impatiens, тосповирус желтой пятнистости арахиса,
Bunyaviridae	тосповирус пятнистого вилта томата
Триховирусы	триховирус хлоротической пятнистости листьев яблони, латентный триховирус Heracleum,
	триховирус T картофеля
Тимовирусы	латентный тимовирус Abelia, тимовирус крапчатости Belladonna, тимовирус
	желтой мозаики Cacao, тимовирус желтизны прожилок Clitoria,
	тимовирус желтой крапчатости Desmodium, тимовирус крапчатости Dulcamara,
	тимовирус мозаики баклажана, латентный тимовирус Erysimum, тимовирус
	желтой мозаики Kennedya, тимовирус складчатой мозаики дыни, тимовирус
	мозаики окры, тимовирус желтой мозаики Ononis, тимовирус
	желтой мозаики маракуйи, тимовирус мозаики Physalis, тимовирус
	крапчатости Plantago, андийский латентный тимовирус картофеля, тимовирус
	крапчатости Scrophularia, тимовирус желтой мозаики турнепса, тимовирус
	некротической мозаики Voandzeia, тимовирус мозаики дикого огурца
Умбравирусы	умбравирус расслоения желтых жилок бобов, умбравирус-имитатор крапчатости
	моркови, умбравирус крапчатости моркови, умбравирус-имитатора крапчатости
	моркови, умбравирус розеток земляного ореха, умбравирус пятнистой крапчатости

	латука, умбравирус крапчатости табака
Варикозавирусы	варикозавирус некроза листьев Freesia, варикозавирус разрастания прожилок латука,
	варикозавирус карликовости табака
Вайкавирусы:	вайкавирус желтизны Anthriscus, вайкавирус хлоротической карликовости маиса,
Sequiviridae	сферический вайкавирус риса тунгро
Предположительные	вирус мозаики прожилок гибридного клевера, потивирус полосатости Alstroemeria,
Негруппированные	потивирус мозаики Amaranthus, амазонский потивирус мозаики лилии,
Вирусы	потивирус мозаики Anthoxanthum, вирус бороздчатости ствола яблони,
	потивирус Aquilegia, рабдовирус Asclepias, рабдовирус
	Atropa belladonna, вирус мозаики ячменя, вирус желтой полосатой мозаики
	ячменя, вирус деформационной мозаики свеклы, рабдовирус курчавости листьев свеклы, западный
	ST9-ассоциированный РНК-вирус желтизны свеклы, вирус некроза
	малины западной, потивирус желтой мозаики ежевики, потивирус легкой
	мозаики баклажана, вирус В кормовых бобов, потивирус V кормовых бобов,
	вирус желтой кольцевой пятнистости кормовых бобов, потивирус крапчатости Bryonia,
	вирус мозаики лопуха, вирус крапчатости лопуха, рабдовирус хлороза
	Callistephus chinensis, потивирус мозаики канареечника тростникового, потивирус
	мозаики Canavalia maritima, рабдовирус гвоздики, потивирус мозаики
	моркови, бессимптомный рабдовирус маниока, вирус мозаики Cassia,

	вирус кольцевой пятнистости <i>Cassia</i> , потивирус желтой мозаики сельдерея, вирус
	желтой сетки сельдерея, вирус огненного хлороза сельдерея, нитевидный потивирус
	нута, потивирус сосудистой крапчатости перца чилийского, потивирус пятнистости
	<i>Chrysanthemum</i> , рабдовирус сосудистого хлороза <i>Chrysanthemum</i> , рабдовирус
	лепроза <i>Citrus</i> , вирус кольцевой пятнистости <i>Citrus</i> , вирус легкой мозаики
	клевера, потивирус полосатости ежи сборной, рабдовирус болезни bobone
	<i>Colocasia</i> , рабдовирус кератоза огурца, вирус пожелтения
	прожилок огурца, потивирус <i>Cyrtipedium calceolus</i> , венгерский потивирус мозаики
	<i>Datura innoxia</i> , потивирус <i>Dioscorea trifida</i> , потивирус
	крапчатой мозаики щавеля, вирус, ассоциированный с пожелтением <i>Dodonaea</i> ,
	потивирус тяжелой крапчатости баклажана, рабдовирус фасциации
	<i>Euonymus</i> , рабдовирус <i>Euonymus</i> , потивирус папоротников, потивирус фигового дерева,
	бессимптомный рабдовирус <i>Gerbera</i> , вирус пятнистости виноградной лозы,
	вирус низкоростости виноградной лозы, вирус некроза верхушки гуара, потивирус мозаики
	<i>Nabenaria</i> , рабдовирус пожелтения <i>Holcus lanatus</i> , потивирус полосатости
	<i>Holcus</i> , рабдовирус полосатости листьев <i>Iris germanica</i> , японский вирус
	некротической кольцевой пятнистости <i>Iris</i> , потивирус мозаики <i>Isachne</i> , изометрический вирус
	<i>Kalanchoe</i> , рабдовирус посветления жилок кенафа, потивирус мозаики <i>Launaea</i> ,

	рабдовирус желтизны прожилок люпина, вирус глазковой пятнистости маиса, вирус линии
	маиса, вирус крапчатости/хлоротической низкорослости маиса, вирус мозаики белой линии
	маиса, вирус крапчатости <i>Malvastrum</i> , потивирус мозаики <i>Melilotus</i> , потивирус
	прожилковой мозаики дыни, потивирус крапчатости <i>Melothria</i> ,
	вирус мозаики <i>Mimosa</i> , потивирус крапчатости золотистой фасоли, потивирус
	вырождения <i>Narcissus</i> , потивирус позднего сезонного пожелтения <i>Narcissus</i> ,
	потивирус <i>Y Nerine</i> , потивирус мозаики <i>Nothoscordum</i> , вирус кольцевой пятнистости
	дуба, рабдовирус пятнистости орхидеи, потивирус мозаики пальмы, потивирус
	зеленой крапчатости петрушки, рабдовирус петрушки, вирус курчавости листьев пастернака,
	шри-ланкийский потивирус крапчатости маракуйи, рабдовирус посветления прожилок
	маракуйи, рабдовирус крапчатости пачули, вирус некроза стебля гороха,
	потивирус остановки роста верхушки арахиса, рабдовирус хлороза прожилок арахиса,
	потивирус мозаики <i>Pecteilis</i> , потивирус легкой мозаики перца, потивирус крапчатости
	<i>Perilla</i> , рабдовирус пролиферации голубинового гороха, вирус
	стерильной мозаики голубинового гороха, потивирус 7 плантана, рабдовирус крапчатости
	плантана, потивирус <i>Pleioblastus chino</i> , потивирус увядания тополя,
	потивирус крапчатости <i>Primula</i> , вирус мозаики грандиллы пурпурной,
	бессимптомный вирус <i>Ranunculus repens</i> , вирус желтой низкорослости

	риса, рабдовирус некроза листьев <i>Saintpaulia</i> , рабдовирус посветления
	прожилков <i>Sambucus</i> , рабдовирус <i>Sarracenia purpurea</i> , потивирус
	хлоротической кольцевой пятнистости клевера ползучего, вирус легкой мозаики сои, рабдовирус
	сои, сферический вирус сои, вирус желтых прожилок сои,
	потивирус Z сои, латентный рабдовирус C клубники, вирус
	крапчатости клубники, вирус паллидоза клубники, потивирус мозаики
	подолнечника, латентный потивирус батата, потивирус мозаика ворсянки,
	вирус кольцевой пятнистости малины мелкоцветной, потивирус легкой крапчатости томата,
	потивирус крапчатости <i>Trichosanthes</i> , вирус кольцевого некроза тюльпана, вирус
	мозаики тюльпана, вирус посветления прожилок тюльпана, вирус курчавости листьев
	фасоли мунго, рабдовирус мозаики <i>Vigna sinensis</i> , вирус желтой пятнистости
	кресса водяного, потивирус мозаики марокканского арбуза, рабдовирус хлоротической
	пятнистости пшеницы, потивирус белой брioniии, латентный вирус малины японской,
	потивирус легкой крапчатости <i>Zinnia</i> , потивирус мозаики <i>Zoysia</i>

С. Доставка по отношению к симбионту растений

В данном документе представлены способы доставки симбионту растения композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе), раскрытой в данном документе. Представлены способы доставки композиции на основе РМР симбионту (например, бактериальному эндосимбионту, грибковому эндосимбионту или насекомому) путем приведения в контакт симбионта с композицией на основе РМР. Способы могут быть применимы для повышения приспособленности симбионта растения, например симбионта, который полезен для приспособленности растения. В некоторых случаях симбионты растений могут быть обработаны посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство.

В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, удобрения.

Таким образом, эти способы можно применять для повышения приспособленности симбионта растения. В одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности симбионта, где способ включает доставку по отношению к симбионту композиции на основе РМР, описанной в данном документе (например, в эффективном количестве и в течение эффективного периода времени), для повышения приспособленности симбионта по сравнению с необработанным симбионтом (например, симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР).

В одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности гриба (например, грибкового эндосимбионта растения), где способ включает доставку по отношению к эндосимбионту композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе). Например, симбионт растения может быть эндосимбиотическим грибом, таким как гриб рода *Aspergillaceae*, *Ceratobasidiaceae*, *Coniochaetaceae*, *Cordycipitaceae*, *Corticaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Davidiellaceae*, *Debaryomycetaceae*, *Dothioraceae*, *Erysiphaceae*, *Filobasidiaceae*, *Glomerellaceae*, *Hydnaceae*, *Hyposcreaceae*, *Leptosphaeriaceae*, *Montagnulaceae*, *Mortierellaceae*, *Mycosphaerellaceae*, *Nectriaceae*, *Orbiliaceae*, *Phaeosphaeriaceae*, *Pleosporaceae*, *Pseudeurotiaceae*, *Rhizopodaceae*, *Sclerotiniaceae*, *Stereaceae*, или *Trichocomaceae*.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности бактерии (например, бактериального эндосимбионта растений), где способ включает доставку по отношению к бактерии композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе). Например, симбионт растения может быть эндосимбиотической бактерией, такой как бактерия рода *Acetobacteraceae*, *Acidobacteriaceae*, *Acidothermaceae*, *Aerococcaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Alteromonadaceae*, *Anaerolineaceae*, *Aurantimonadaceae*, *Bacillaceae*, *Bacteriovoracaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Carboxydocellaceae*, *Caulobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Chitinophagaceae*, *Chromatiaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *Chthonomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Coxiellaceae*, *Cryomorphaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Deinococcaceae*, *Dermabacteraceae*, *Dermacoccaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Fibrobacteraceae*, *Flammeovirgaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Frankiaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Gaiellaceae*, *Gemmatimonadaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Glycornycetaceae*, *Haliangiaceae*, *Halomonadaceae*, *Holosporaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Iamiaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Kineosporiaceae*, *Koribacteraceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Legionellaceae*, *Leptospiraceae*, *Leuconostocaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Methylophilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Moraxellaceae*, *Mycobacteriaceae*,

Mycoplasmataceae, Мyxococcaceae, Nakamurellaceae, Neisseriaceae, Nitrosomonadaceae, Nocardiaceae, Nocardioideae, Oceanospirillaceae, Opitutaceae, Oxalobacteraceae, Paenibacillaceae, Parachlamydiaceae, Pasteurellaceae, Patulibacteraceae, Peptostreptococcaceae, Phyllobacteriaceae, Piscirickettsiaceae, Planctomycetaceae, Planococcaceae, Polyangiaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Promicromonosporaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhizobiaceae, Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae, Roseiflexaceae, Rubrobacteriaceae, Sandaracinaceae, Sanguibacteraceae, Saprospiraceae, Segniliparaceae, Shewanellaceae, Sinobacteraceae, Solibacteraceae, Solimonadaceae, Solirubrobacteraceae, Sphingobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Spiroplasmataceae, Sporichthyaceae, Sporolactobacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Streptomycetaceae, Syntrophobacteraceae, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Weeksellaceae*, *Xanthobacteraceae*, *или* Xanthomonadaceae.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности насекомого (например, насекомого-симбионта растения), где способ включает доставку по отношению к насекомому композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР (например, композиции на основе РМР, описанной в данном документе). В некоторых случаях насекомое является опылителем растений. Например, насекомое может быть из рода Hymenoptera или Diptera. В некоторых случаях насекомое из рода Hymenoptera является пчелой. В других случаях насекомое из рода Diptera является мухой.

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде улучшения физиологических процессов у симбионта (например, улучшения состояния здоровья или выживаемости) вследствие введения композиции на основе РМР. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена посредством одного или нескольких параметров, включая без ограничения скорость размножения, продолжительность жизни, подвижность, плодовитость, вес тела, скорость или активность метаболизма или выживаемость по сравнению с симбионтом, которому композиция на основе РМР не была доставлена. Например, способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для улучшения общего состояния здоровья симбионта или для улучшения общей выживаемости симбионта по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях улучшение выживаемости симбионта составляет приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР). В некоторых случаях способы и композиции являются эффективными для повышения интенсивности размножения симбионта (например, скорости размножения) по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы и композиции

эффективны для повышения 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде увеличения частоты или эффективности требуемой активности, осуществляемой симбионтом (например, опыления, истребления вредителей, распространения семян или разрушения отходов или органического материала), по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для увеличения частоты или эффективности требуемой активности, осуществляемой симбионтом (например, опыления, истребления вредителей, распространения семян или разрушения отходов или органического материала), на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде увеличения синтеза одного или нескольких питательных веществ в организме симбионта (например, витаминов, углеводов, аминокислот или полипептидов) по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для повышения синтеза питательных веществ в организме симбионта (например, витаминов, углеводов, аминокислот или полипептидов) на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР). В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут обеспечивать увеличение содержания питательных веществ в ассоциированном растении путем увеличения синтеза или метаболизма питательных веществ одним или несколькими микроорганизмами (например, эндосимбионтами) в организме симбионта.

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде снижения восприимчивости симбионта к пестицидному средству и/или увеличения устойчивости симбионта к пестицидному средству по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения восприимчивости симбионта к пестицидному средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с

референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде снижения восприимчивости симбионта к аллелохимическому средству и/или повышения устойчивости симбионта к аллелохимическому средству по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для повышения устойчивости симбионта к аллелохимическому средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР). В некоторых случаях аллелохимическое средство представляет собой кофеин, цистатин N сои, монотерпены, дитерпеновые кислоты или фенольные соединения. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут снижать восприимчивость симбионта к аллелохимическому средству посредством повышения способности симбионта метаболизировать аллелохимическое средство или расщеплять его на пригодные к использованию субстраты.

В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для повышения устойчивости симбионта к паразитам или патогенам (например, грибным, бактериальным или вирусным патогенам или паразитическим микроскопическим клещам (например, к клещу *Varroa destructor* у медоносных пчел)) по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для повышения устойчивости симбионта к патогену или паразиту (например, грибным, бактериальным или вирусным патогенам или паразитическим микроскопическим клещам (например, к клещу *Varroa destructor* у медоносных пчел)) на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у симбионта, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде других преимуществ приспособленности, таких как улучшенная переносимость определенных факторов окружающей среды (например, переносимость высокой или низкой температуры), улучшенная способность к выживанию в определенных средах обитания или улучшенная способность выдерживать определенный рацион (например, улучшенная способность метаболизировать сою по сравнению с кукурузой), по сравнению с организмом-симбионтом, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для

повышения приспособленности симбионта посредством множества путей, описанных в данном документе. Дополнительно композиция на основе РМР может повышать приспособленность симбионта в любом количестве классов, порядков, семейств, родов или видов симбионта (например, 1 вида симбионта, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, или более видов симбионтов). В некоторых случаях композиция на основе РМР действует на один класс, отряд, семейство, род или вид симбионтов.

Приспособленность симбионта можно оценивать посредством любых стандартных способов из данной области техники. В некоторых случаях приспособленность симбионта может быть оценена посредством оценки отдельного симбионта. В качестве альтернативы приспособленность симбионта может быть оценена посредством оценки популяции симбионтов. Например, повышение приспособленности симбионта может проявляться в виде повышения степени успешного конкурирования с другими насекомыми, что тем самым приводит к увеличению размера популяции симбионта.

Примеры симбионтов растений, которые можно обрабатывать композициями по настоящему изобретению или посредством соответствующих способов по настоящему изобретению, дополнительно описаны ниже.

i. Грибы

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для повышения приспособленности гриба, например гриба, который является эндосимбионтом растения (например, микоризного гриба).

В некоторых случаях гриб относится к семейству *Aspergillaceae*, *Ceratobasidiaceae*, *Coniochaetaceae*, *Cordycipitaceae*, *Corticaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Davidiellaceae*, *Debaryomycetaceae*, *Dothioraceae*, *Erysiphaceae*, *Filobasidiaceae*, *Glomerellaceae*, *Hydnaceae*, *Hydrocreaceae*, *Leptosphaeriaceae*, *Montagnulaceae*, *Mortierellaceae*, *Mycosphaerellaceae*, *Nectriaceae*, *Orbiliaceae*, *Phaeosphaeriaceae*, *Pleosporaceae*, *Pseudeurotiaceae*, *Rhizopodaceae*, *Sclerotiniaceae*, *Stereaceae*, или *Trichocomaceae*.

В некоторых случаях гриб представляет собой гриб, имеющий микоризную (например, эктомикоризную или эндомикоризную) ассоциацию с корнями растения, включая грибы, принадлежащие к отделам *Glomeromycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* или *Zygomycota*.

i. Бактерии

Композиции на основе РМР и связанные способы могут быть применимы для повышения приспособленности бактерии, например бактерии, которая является эндосимбионтом растения (например, азот-фиксирующей бактерии).

Например, бактерия может относиться к роду *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Saccharibacillus*, *Sphingomonas* или *Stenotrophomonas*.

В некоторых случаях бактерия относится к семейству: *Acetobacteraceae*,

Acidobacteriaceae, Acidothermaceae, Aerococcaceae, Alcaligenaceae, Alicyclobacillaceae, Alteromonadaceae, Anaerolineaceae, Aurantimonadaceae, Bacillaceae, Bacteriovoracaceae, Bdellovibrionaceae, Bradyrhizobiaceae, Brevibacteriaceae, Brucellaceae, Burkholderiaceae, Carboxydocellaceae, Caulobacteraceae, Cellulomonadaceae, Chitinophagaceae, Chromatiaceae, Chthoniobacteraceae, Chthonomonadaceae, Clostridiaceae, Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Coxiellaceae, Cryomorphaeae, Cyclobacteriaceae, Cytophagaceae, Deinococcaceae, Dermabacteraceae, Dermacoccaceae, Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Erythrobacteraceae, Fibrobacteraceae, Flammeovirgaceae, Flavobacteriaceae, Frankiaceae, Fusobacteriaceae, Gaiellaceae, Gemmatimonadaceae, Geodermatophilaceae, Gly corny cetaceae, Haliangiaceae, Halomonadaceae, Holosporaceae, Hyphomicrobiaceae, Iamiaceae, Intrasporangiaceae, Kineosporiaceae, Koribacteraceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Legionellaceae, Leptospiraceae, Leuconostocaceae, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae, Methylophilaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Moraxellaceae, Mycobacteriaceae, Mycoplasmataceae, Мyxococcaceae, Nakamurellaceae, Neisseriaceae, Nitrosomonadaceae, Nocardiaceae, Nocardioideae, Oceanospirillaceae, Opitutaceae, Oxalobacteraceae, Paenibacillaceae, Parachlamydiaceae, Pasteurellaceae, Patulibacteraceae, Peptostreptococcaceae, Phyllobacteriaceae, Piscirickettsiaceae, Planctomycetaceae, Planococcaceae, Polyangiaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Promicromonosporaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhizobiaceae, Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae, Roseiflexaceae, Rubrobacteriaceae, Sandaracinaceae, Sanguibacteraceae, Saprospiraceae, Segniliparaceae, Shewanellaceae, Sinobacteraceae, Solibacteraceae, Solimonadaceae, Solirubrobacteraceae, Sphingobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Spiroplasmataceae, Sporichthyaceae, Sporolactobacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Streptomycetaceae, Syntrophobacteraceae, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Weeksellaceae*, *Xanthobacteraceae*, или Xanthomonadaceae.

В некоторых случаях эндосимбиотическая бактерия относится к семейству, выбранному из группы, состоящей из: Bacillaceae, Burkholderiaceae, Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Paenibacillileae, Pseudomonaceae, Rhizobiaceae, Sphingomonadaceae и Xanthomonadaceae.

В некоторых случаях эндосимбиотическая бактерия относится к роду, выбранному из группы, состоящей из: Acidovorax, Agrobacterium, Bacillus, Burkholderia, Chryseobacterium, Curtobacterium, Enterobacter, Escherichia, Methylobacterium, Paenibacillus, Pantoea, Pseudomonas, Ralstonia, Saccharibacillus, Sphingomonas, и Stenotrophomonas.

ii. Насекомые

Композиции на основе РМР и связанные способы могут быть применимы для повышения приспособленности насекомого, например, насекомого, полезного для растений. 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. Например, хозяин может включать насекомых, которых используют в вариантах сельскохозяйственного применения, в том числе насекомых, которые способствуют опылению сельскохозяйственных культур, распространению семян или контролю вредителей.

В некоторых случаях хозяин способствует опылению растения (например, пчелы, жуки, осы, мухи, бабочки или моли). В некоторых случаях хозяином, способствующим опылению растения, является пчела. В некоторых случаях пчела принадлежит к семейству Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae или Megachilidae. В некоторых примерах хозяином, способствующим опылению растения, является жук. В конкретных случаях композиция на основе РМР может использоваться для повышения приспособленности медоносной пчелы.

В некоторых случаях хозяином, способствующим опылению растения, является жук, например, вид из семейства Buprestidae, Cantharidae, Cerambycidae, Chrysomelidae, Cleridae, Coccinellidae, Elateridae, Melandryidae, Meloidae, Melyridae, Mordellidae, Nitidulidae, Oedemeridae, Scarabaeidae или Staphylinidae.

В некоторых случаях хозяином, способствующим опылению растения, является бабочка или моль (например, Lepidoptera). В некоторых случаях бабочка или моль представляет собой вид из семейства Geometridae, Hesperidae, Lycaenidae, Noctuidae, Nymphalidae, Papilionidae, Pieridae или Sphingidae.

В некоторых случаях хозяином, способствующим опылению растения, является муха (например, Diptera). В некоторых случаях муха принадлежит к семейству Anthomyiidae, Bibionidae, Bombyliidae, Calliphoridae, Cecidomyiidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Conopidae, Culicidae, Dolichopodidae, Empididae, Ephydriidae, Lonchopteridae, Muscidae, Mycetophilidae, Phoridae, Simuliidae, Stratiomyidae или Syrphidae.

В некоторых случаях хозяином, способствующим опылению растения, является муравей (например, Formicidae), пилильщик (например, Tenthredinidae) или оса (например, Sphecidae или Vespidae).

D. Доставка по отношению к патогену животных

В данном документе представлены способы доставки композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) по отношению к патогену животного (например, человека), к такому как патоген, раскрытый в данном документе, путем приведения в контакт патогена с композицией на основе РМР. 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 животных, как, например, у людей.

В некоторых случаях патоген животного (например, человека) может быть подвергнут обработке посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство. В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, гетерологичное терапевтическое средство (например, антибактериальное средство, противогрибковое средство, инсектицид, нематоцид, противопаразитарное средство, противовирусное средство или репеллент). Способы могут являться полезными для снижения приспособленности патогена животного, например, для предупреждения или лечения инфекции, вызванной патогеном, или контроля распространения патогена вследствие доставки композиции на основе РМР.

Примеры патогенов, на которые можно целенаправленно воздействовать в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают бактерии (например, *Streptococcus* spp., *Pneumococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., или *Escherichia* spp), грибы (*Saccharomyces* spp. или *Candida* spp), насекомые-паразиты (например, *Cimex* spp), паразитические нематоды (например, *Heligmosomoides* spp) или паразитические простейшие (например, *Trichomoniasis* spp).

Например, в данном документе представлен способ снижения приспособленности патогена, при этом способ включает доставку по отношению к патогену композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает снижение приспособленности 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, по отношению к патогену) в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

Также в данном документе представлен способ снижения приспособленности насекомого-паразита, где способ включает доставку по отношению к насекомому-паразиту композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку насекомому-паразиту композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, где совокупность РМР включает инсектицидное средство. Например, насекомым-паразитом может являться постельный клоп. В данном документе представлены другие неограничивающие примеры насекомых-паразитов. В некоторых случаях способ снижает приспособленность насекомого-паразита по сравнению с необработанным насекомым-паразитом.

Дополнительно в данном документе представлен способ снижения

приспособленности паразитической нематоды, где способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к паразитической нематоды композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, где совокупность РМР включает нематоцидное средство. Например, паразитической нематодой является *Heligmosomoides polygyrus*. В данном документе представлены другие неограничивающие примеры паразитических нематод. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение приспособленности паразитической нематоды по сравнению с необработанной паразитической нематодой.

Дополнительно в данном документе представлен способ снижения приспособленности паразитического простейшего, где способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к паразитическому простейшему композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, где совокупность РМР включает противопаразитарное средство. Например, паразитическим простейшим может являться *T. vaginalis*. В данном документе представлены другие неограничивающие примеры паразитических простейших. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение приспособленности паразитического простейшего по сравнению с необработанным паразитическим простейшим.

Снижение приспособленности патогена вследствие доставки композиции на основе РМР может проявляться различными путями. В некоторых случаях снижение приспособленности патогена может проявляться в виде ухудшения или снижения физиологических функций патогена (например, ухудшения состояния здоровья или выживаемости) вследствие доставки композиции на основе РМР. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена посредством одного или нескольких параметров, в том числе без ограничения, скорости размножения, фертильности, продолжительности жизни, жизнеспособности, подвижности, репродуктивной способности, развития патогена, массы тела, скорости или активности метаболизма или выживаемости по сравнению с патогеном, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. Например, способы или композиции, представленные 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, обнаруживаемым у патогена, который не получает композицию на основе РМР). В некоторых случаях способы и композиции эффективны для снижения размножения патогена (например, скорости размножения, фертильности) по сравнению с патогеном, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у патогена, который не получает композицию на основе РМР).

В некоторых случаях снижение приспособленности вредителя может проявляться в виде повышения восприимчивости патогена к антипатогенному средству и/или снижения устойчивости патогена к антипатогенному средству по сравнению с патогеном, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для повышения восприимчивости патогена к пестицидному средству на приблизительно 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у вредителя, который не получает композицию на основе РМР).

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 выдерживать определенный рацион по сравнению с патогеном, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения приспособленности патогена посредством множества путей, описанных в данном документе. Кроме того, композиция на основе РМР 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 на основе РМР действует на один класс, отряд, семейство, род или вид вредителей.

Приспособленность патогена можно оценивать посредством любых стандартных способов из данной области техники. 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 тем самым приводит к уменьшению размера популяции патогена.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы, описанные в данном документе, применимы для снижения приспособленности патогена животных и тем самым лечения или предупреждения инфекций у животных. В данном документе дополнительно описаны примеры патогенов животных или их переносчиков, которые можно подвергать обработке композициями по настоящему изобретению или посредством соответствующих способов по настоящему изобретению.

i. Грибы

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности гриба, например, для предупреждения или лечения грибковой инфекции у животного. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к грибу путем приведения в контакт гриба с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение грибковой инфекции (например, вызванной грибом, описанным в данном документе) у животного, подверженного риску ее возникновения или нуждающегося в ее лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР 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 избыточный рост могут 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, вызываемых *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 посредством способов, раскрытых в данном документе, включая без ограничения кандидемия, орофарингеальный 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, кардиоваскулярный кандидоз (например, эндокардит) и инвазивный кандидоз.

ii. Бактерии

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности бактерии, например, для предупреждения или лечения бактериальной инфекции у животного. Представлены способы введения композиции на

основе РМР по отношению к бактерии путем приведения в контакт бактерии с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение бактериальной инфекции (например, вызванной бактериями, описанными в данном документе) у животного, подверженного риску ее возникновения или нуждающегося в ее лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР 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*).

iii. Насекомые-паразиты

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности насекомого-паразита, например, для предупреждения или лечения инвазии насекомыми-паразитами у животных. 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. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к насекомому путем приведения в контакт насекомого с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение инвазии насекомым-паразитом (например, инфекции, передаваемой насекомым-паразитом, описанным в данном документе) у животного, подверженного риску или нуждающегося в лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения инвазии насекомым-паразитом у животных, включая инфекции, передаваемые насекомыми, принадлежащими 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* (*сленни*), *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 птиц), *Macronyssidae* (клещи птиц), *Argasidae* (аргасовые клещи), *Ixodidae* (иксодовые клещи).

iv. Простейшие

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности паразитического простейшего, например, для предупреждения или лечения у животных инвазии паразитическими простейшими. Термин "простейшие" включает любой организм, принадлежащий к типу Protozoa. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к паразитическому простейшему путем приведения в контакт паразитического простейшего с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение протозойной инфекции (например, вызванной простейшими, описанными в данном документе) у животного, подверженного риску ее возникновения или нуждающегося в ее лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения у животных инвазии паразитическими простейшими, в том числе простейшими, принадлежащими 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 cayentanensis*, *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*).

v. Нематоды

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности паразитической нематоды, например, для предупреждения или лечения у животных инвазии паразитической нематодой. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к паразитической нематоды путем приведения в контакт паразитической нематоды с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение инвазии паразитической нематодой (например, инвазии, вызываемой паразитической нематодой, описанной в данном документе) у животного, подверженного риску ее возникновения или нуждающегося в ее лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР и соответствующие способы пригодны для предупреждения или лечения инфицирования животных паразитическими нематодами,

включая нематод, 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).

vi. Вирусы

Композиции на основе РМР и соответствующие способы могут быть применимы для снижения приспособленности вируса, например, для предупреждения или лечения вирусной инфекции у животного. Представлены способы доставки композиции на основе РМР по отношению к вирусу путем приведения в контакт вируса с композицией на основе РМР. Дополнительно или в качестве альтернативы способы включают предупреждение или лечение вирусной инфекции (например, вызванной вирусом, описанным в данном документе) у животного, подверженного риску ее возникновения или нуждающегося в ее лечении, путем введения животному композиции на основе РМР.

Композиции на основе РМР 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*).

Е. Доставка по отношению к переносчику патогена

В данном документе представлены способы доставки композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) по отношению к переносчику патогена, такому как раскрытый в данном документе, путем приведения в контакт переносчика патогена с композицией на основе РМР. Используемый в данном документе термин "переносчик" относится к насекомому, которое может передавать или переносить патоген 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 у представителей *Arachnidae*, такие как иксодовые клещи и микроскопические клещи.

В некоторых случаях переносчик патогена животного (например, человека) может

быть обработан посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство. В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, гетерологичное терапевтическое средство (например, антибактериальное средство, противогрибковое средство, инсектицид, нематоцид, противопаразитарное средство, противовирусное средство или репеллент). Способы могут являться применимыми для снижения приспособленности переносчика патогена, например, для контроля распространения патогена вследствие доставки композиции на основе РМР. Примеры переносчиков патогенов, на которые можно целенаправленно воздействовать в соответствии со способами, представленными в данном документе, включают насекомых, описанных в данном документе.

Например, в данном документе представлен способ снижения приспособленности переносчика патогена животных, при этом способ включает доставку по отношению к переносчику эффективного количества композиций на основе РМР, описанных в данном документе, где способ обеспечивает снижение приспособленности 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 представлен способ снижения приспособленности насекомого, являющегося переносчиком патогена животного, где способ включает доставку по отношению к переносчику композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает доставку по отношению к переносчику композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, где совокупность РМР включает инсектицидное средство. Например, насекомым-переносчиком может являться комар, клещ, микроскопический клещ или вошь. В данном документе представлены другие неограничивающие примеры переносчиков патогенов. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение приспособленности 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) вследствие введения композиции. В некоторых случаях приспособленность организма может быть измерена посредством 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, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции. Например, способы или композиции, представленные 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым 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 организмом-переносчиком, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции. 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым у переносчика, по отношению к которому не осуществляют доставку композиции).

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 организмом-переносчиком, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции. В некоторых случаях способы или композиции, представленные 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 100% по сравнению с референтным уровнем (например, уровнем, выявляемым 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, представленные 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, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции.

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 выдерживать определенный рацион по сравнению с организмом-переносчиком, по отношению к которому не осуществляли введение композиции на основе РМР. В некоторых случаях способы или композиции, представленные в данном документе, могут быть эффективными для снижения

приспособленности переносчика посредством множества путей, описанных в данном документе. Кроме того, 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 посредством любых стандартных способов из данной области техники. 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 тем самым приводит к уменьшению размера популяции переносчика.

Благодаря снижению приспособленности переносчиков, которые переносят патогены животных, представленные в данном документе композиции являются эффективными для снижения распространения заболеваний, передаваемых переносчиками. Композицию можно доставлять по отношению к насекомым посредством 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, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции. 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, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции.

Неограничивающие примеры заболеваний, контроль которых можно осуществлять посредством композиций и способов, представленных в данном документе, включают заболевания, вызываемые вирусами *Togaviridae* (например, чикунгунья, лихорадка реки Росс, лихорадка Майаро, лихорадка Онионг-Нионг, лихорадка Синдбис, восточный лошадиный энцефаломиелит, западный лошадиный энцефаломиелит, венесуэльский лошадиный энцефаломиелит или лихорадка леса Барма); заболевания, вызываемые вирусами *Flaviviridae* (например, лихорадка Денге, желтая лихорадка, болезнь Кьясанурского леса, омская геморрагическая лихорадка, японский энцефалит, энцефалит долины Муррея, энцефалит Росио, энцефалит Сент-Луис, энцефалит Западного Нила или клещевой энцефалит); заболевания, вызываемые вирусами *Bunyaviridae* (например,

москитная лихорадка, лихорадка долины Рифт, энцефалит, вызываемый вирусом Ла Кросс, калифорнийский энцефалит, геморрагическая лихорадка Крым-Конго или лихорадка Оропуч); заболевания, вызываемые вирусами Rhabdoviridae (например, везикулярный стоматит); заболевания, вызываемые вирусами Orbiviridae (например, блутанг); заболевания, вызываемые бактериями (например, чума, туляремия, ку-лихорадка, пятнистая лихорадка Скалистых гор, мышинный тиф, марсельская лихорадка, клещевой тиф Квинсленда, сибирский клещевой тиф, цуцугамуши, возвратная лихорадка или болезнь Лайма); или заболевания, вызываемые простейшими (например, малярия, африканский трипаносомоз, нагана, болезнь Шагаса, лейшманиоз, пироплазмоз, филяриоз Банкрофта или бругиоз).

i. Переносчики патогенов

Способы и композиции, представленные в данном документе, могут быть применимы 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, обнаруженный у насекомых отряда Hemiptera и некоторых из отрядов Hymenoptera и Diptera, у таких как комары, пчелы, осы, мокрецы, вши, муха цеце, блохи и муравьи, а также представителей класса Arachnidae, таких как иксодовые клещи и микроскопические клещи; отряда, класса или семейства Acarina (иксодовых 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., Dermanyssus 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., Sarcophaga 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 представляет собой *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.

F. Доставка по отношению к животному

В данном документе представлены способы доставки композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) по отношению к клетке, ткани животного или субъекту-животному), например, путем приведения клетки, ткани животного, субъекта-животного или их части в контакт с композицией на основе РМР. В некоторых случаях животные могут быть подвергнуты обработке посредством РМР, не содержащих гетерологичное функциональное средство. В других случаях РМР содержат гетерологичное функциональное средство, например, гетерологичное терапевтическое средство (например, терапевтический белок, или пептидную нуклеиновую кислоту, или малую молекулу, антибактериальное средство, противогрибковое средство, инсектицид, нематоцид, противопаразитарное средство, противовирусное средство или репеллент).

В одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности животного, при этом способ предусматривает доставку по отношению к животному композиции на основе РМР, описанной в данном документе (например, в эффективном количестве и в течение эффективного периода времени), для повышения приспособленности животного по сравнению с необработанным животным (например, животным, по отношению к которому не осуществляли доставку композиции на основе РМР).

Повышение приспособленности животного в результате доставки композиции на основе РМР может быть определено посредством любого способа оценки приспособленности животного (например, приспособленности млекопитающего, например, приспособленности (например, здоровья) человека).

В данном документе представлен способ модификации или повышения приспособленности животного, при этом способ включает доставку по отношению к животному эффективного количества композиции на основе РМР, представленной в данном документе, где способ обеспечивает модификацию животного и тем самым вводится или усиливается полезный признак у животного (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным животным. В частности, способ может обеспечить повышение приспособленности животного, например млекопитающего, например человека (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным животным.

В дополнительном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности животного, при этом способ включает приведение клетки животного в контакт с эффективным количеством композиции на основе РМР, описанной в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности животного, например млекопитающего, например человека (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%) по сравнению с необработанным животным.

В определенных случаях животное является млекопитающим, например, человеком. В определенных случаях животное представляет собой животное, относящееся к домашнему скоту, или сельскохозяйственное животное. В определенных случаях животное представляет собой мышь.

G. Способы применения

Растение, описанное в данном документе, можно подвергать воздействию композиции на основе РМР (например, содержащей модифицированные РМР, описанные в данном документе) любым подходящим способом, который обеспечивает доставку или введение композиции по отношению к растению. Композицию на основе РМР можно доставлять либо отдельно, либо в комбинации с другими активными (например, удобряющими средствами) или неактивными веществами и можно наносить, например, посредством распыления, инъекции (например, 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 на основе РМР. Количества и места для применения композиций, описанных в данном документе, как правило, определяются условиями обитания растения, стадией жизненного цикла, на которой на растение можно целенаправленно воздействовать посредством композиции на основе РМР, участком, в котором применение должно выполняться, а также физическими и функциональными характеристиками композиции на основе РМР.

В некоторых случаях композицию распыляют непосредственно на растение, например, сельскохозяйственные культуры, например, путем распыления из ранца, распыления с воздуха, опрыскивания/опыления растительных культур и т. д. В тех случаях, когда композицию на основе РМР доставляют по отношению к растению, растение, получающее композицию на основе РМР, может находиться на любой стадии роста растения. Например, составленные композиции на основе РМР можно применять в виде покрытия для семян или средства для обработки корней на ранних стадиях роста растения или в виде средства для полной обработки растения на более поздних стадиях цикла урожая. В некоторых случаях композицию на основе РМР можно применять по отношению к растению в виде средства для местного применения.

Кроме того, композицию на основе РМР 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. В некоторых случаях растения или употребляемые в пищу организмы могут быть генетически трансформированы для экспрессии композиции на основе РМР.

Замедленное или непрерывное высвобождение также может достигаться посредством покрытия композиции на основе РМР или композиции с композицией(-ями) на основе РМР растворимым или биodeградируемым слоем, таким как желатин, при этом данное покрытие растворяется или разрушается в среде для применения, что затем делает композицию на основе РМР доступной, или посредством распределения средства в растворимой или разрушаемой матрице. Такие средства с непрерывным высвобождением и/или распределением могут быть предпочтительно использованы для устойчивого поддержания эффективной концентрации одной или нескольких композиций на основе РМР, описанных в данном документе.

В некоторых случаях композицию на основе РМР по отношению к части растения, например, его листа, семени, пыльцы, корня, плода, побега или цветка, или ткани, клетки или протопласта. В некоторых случаях композицию на основе РМР доставляют в клетку растения. В некоторых случаях композицию на основе РМР доставляют по отношению к протопласту растения. В некоторых случаях композицию на основе РМР доставляют по отношению к ткани растения. Например, композиция может доставляться по отношению к меристематической ткани растения (например, апикальной меристемы, латеральной меристемы или интеркалярной меристемы). В некоторых случаях композицию доставляют по отношению к постоянной ткани растения (например, простым тканям (например, паренхиме, колленхиме или склеренхиме) или сложной постоянной ткани (например, ксилеме или флоэме)). В некоторых случаях композицию доставляют по отношению к зародышу растения.

В некоторых случаях композиция на основе РМР может быть рекомендована для применения в полевых условиях в виде количества РМР на гектар (г/га или кг/га) или количества действующего вещества (например, РМР с гетерологичным функциональным средством или без него) или кислотного эквивалента на гектар (кг д.в./га или г д.в./га). В некоторых случаях может потребоваться меньшее количество гетерологичного функционального средства в композициях по настоящему изобретению для нанесения на почву, в среду для растения, семена, ткань растений или растения для достижения тех же результатов, что и в случае применения гетерологичного функционального средства в композиции, не содержащей РМР. Например, количество гетерологичного функционального средства может использоваться на уровнях, которые 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 гетерологичное функциональное средство, применяемое в композиции, не содержащей РМР, например, при непосредственном нанесении того же гетерологичного

функционального средства без РМР. Композиции на основе РМР по настоящему изобретению могут применяться в различных количествах на гектар, например, приблизительно 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 1, 2, 10, 100, 1000, 2000, 5000 (или в любом диапазоне от 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.

Н. Терапевтические способы

Композиции на основе РМР (например, содержащие модифицированные РМР, описанные в данном документе) также могут быть применимы в различных терапевтических способах. Например, способы и композиция могут использоваться для предупреждения или лечения инфекций, вызываемых патогенами, у животных (например, людей). Используемый в данном документе термин "лечение" относится к введению фармацевтической композиции животному в профилактических и/или терапевтических целях. Термин "предупредить инфекцию" относится к профилактической обработке животного, которое еще не болеет, но которое восприимчиво или иным образом подвержено риску возникновения определенного заболевания. Термин "лечить инфекцию" относится к назначению лечения животному, уже страдающему заболеванием, для улучшения или стабилизации состояния животного. Способы по настоящему изобретению включают доставку композиций на основе РМР, описанных в данном документе, по отношению к животному, такому как человек.

Например, в данном документе представлен способ лечения животного, пораженного грибковой инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает введение животному эффективного количества композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, где совокупность РМР включает противогрибковое средство. В некоторых случаях противогрибковое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена в грибе, вызывающем грибковую инфекцию (например, белка усиленного роста нитевидной формы (EFG1)). В некоторых случаях грибковую инфекцию вызывает *Candida albicans*. В некоторых случаях композиция включает РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ обеспечивает ослабление или по сути устранение грибковой инфекции.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения животного, пораженного бактериальной инфекцией, где способ включает введение животному эффективного количества композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР. В некоторых случаях способ включает введение животному эффективного количества композиции на основе РМР, содержащей совокупность РМР, и где совокупность РМР включает антибактериальное средство (например, амфотерицин В). В некоторых случаях бактерия представляет собой бактерию вида *Streptococcus*, вида *Pneumococcus*, вида *Pseudomonas*, вида *Shigella*, вида *Salmonella*, вида *Campylobacter* или вида *Escherichia*. В

некоторых случаях композиция содержит РМР, полученный из EV апопласта *Arabidopsis*. В некоторых случаях способ обеспечивает снижение или в значительной степени устраняет бактериальную инфекцию. В некоторых случаях животное представляет собой человека, сельскохозяйственное животное или животное, относящееся к домашнему скоту.

Настоящие способы применимы для лечения инфекции (например, вызванной патогеном животного) у животного, что означает назначение лечения 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 индивидууму (например, уменьшение колонизации в той степени, которая достаточна для устранения симптомов). В таких случаях лечение инфекции 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 лечение инфекции эффективно 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 означает уменьшение инфекции в степени, достаточной для устойчивого разрешения симптомов (например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев) у животного.

Способы по настоящему изобретению применимы для предупреждения инфекции (например, вызванной патогеном животного), что означает предупреждение 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 более 100% по сравнению с необработанным животным) в той степени, которая достаточна для поддержания исходной популяции патогенов (например, примерно количества, выявляемого у здорового индивидуума), предупреждения начала возникновения инфекции и/или предупреждения симптомов или состояний, ассоциированных с инфекцией. Например, профилактическую обработку для предупреждения возникновения грибковой инфекции могут получать индивидуумы при подготовке к инвазивной медицинской процедуре (например, при подготовке к хирургическому вмешательству, такому как получение трансплантата, терапия стволовыми клетками, трансплантация, протезирование, длительное или частое получение внутривенная катетеризация или получение лечения в отделении интенсивной терапии), индивидуумы с ослабленным иммунитетом (например, индивидуумы, страдающие раком, ВИЧ/СПИДом или принимающие иммунодепрессанты) или индивидуумы, проходящие

длительную терапию антибиотиками.

Композицию на основе РМР можно составлять для введения или вводить посредством любого подходящего способа, в том числе, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, чрескожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь очага патологического изменения, интракраниально, внутрисуставно, интрапростатически, внутривезикулярно, интратрахеально, интратекально, интраназально, интравагинально, интраректально, местно, интратуморально, перитонеально, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардially, внутривезикулярно, интраокулярно, интраорбитально, 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, посредством кремов или посредством 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 нарушения, подлежащих лечению). В некоторых случаях композицию на основе РМР вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, интраорбитально, посредством имплантации, ингаляционно, 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 представлены различные схемы введения доз, включая без ограничения однократное или многократное введение 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 они будут зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, степени тяжести и течения заболевания, от того, применяют ли его в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза пациента и ответа на композицию на основе РМР. Композицию на основе РМР можно, например, вводить пациенту за один раз или в течение нескольких курсов лечения. При повторных введениях в течение нескольких дней или более длительно, в зависимости от состояния, лечение, как правило, будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания или пока инфекция не перестанет обнаруживаться. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые две недели (например, таким образом, что пациент получает, например, от приблизительно двух до приблизительно двадцати доз композиции

на основе РМР. Можно вводить исходную более высокую нагрузочную дозу, а затем одну или несколько более низких доз. Однако могут применяться и другие схемы введения доз. Прогресс данной терапии легко контролировать посредством стандартных методик и анализов.

В некоторых случаях количество композиции на основе РМР, 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) массы тела индивидуума. В некоторых случаях количество композиции на основе РМР, 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) массы тела индивидуума. Дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более 7 доз). В некоторых случаях композицию на основе РМР, вводимую животному, можно вводить отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. Доза антитела, вводимая при комбинированном лечении, может быть снижена по сравнению с монотерапией. Прогресс данной терапии легко контролировать посредством стандартных методик.

IV. Наборы

В настоящем изобретении также представлен набор, включающий контейнер, содержащий композицию на основе РМР, описанную в данном документе. Набор может дополнительно включать инструкции по нанесению или доставке композиции на основе РМР по отношению к растению в соответствии со способом по настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники будет понятно, что инструкции по применению композиции на основе РМР 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 представлены примеры способов по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике возможно осуществление различных других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Содержание (примеры):

Пример 1.	Выделение пакетов-мессенджеров растений из растений
Пример 2.	Получение очищенных пакетов-мессенджеров растений (РМР)
Пример 3.	Определение характеристик пакета-мессенджера растений

Пример 4.	Определение характеристик стабильности пакета-мессенджера растений
Пример 5.	Загрузка РМР грузом
Пример 6.	Повышение поглощения РМР клетками за счет модификации РМР белками, проникающими сквозь клеточную стенку
Пример 7.	Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с ионными жидкостями
Пример 8.	Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с жидкостями на основе фтористого соединения
Пример 9.	Повышение поглощения РМР за счет составления РМР с детергентами, предназначенными для улучшения проникновения сквозь клеточную стенку
Пример 10.	Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с цвиттер-ионными липидами
Пример 11.	Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с ионизируемыми липидами.
Пример 12.	Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с катионными липидами
Пример 13.	Модификация РМР с использованием катионных липидов
Пример 14.	Модификация РМР с использованием ионизируемых липидов
Пример 15.	Модификация РМР белком целлюлазой, обеспечивающим проникновение сквозь клеточную стенку

Пример 1. Выделение пакетов-мессенджеров растений из растений

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

Схема эксперимента

*а) 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 инфильтрации-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. Инфильтрованные семена извлекали, сушили 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 3 раза 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.

i) 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 описано 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 посредством осаждения или эксклюзионной хроматографии.

Схема эксперимента

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

Фракцию неочищенных РМР из грейпфрута из **примера 1a** 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**.

b) 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 1a**, а очищенные РМР получали с применением 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**.

d) 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 pH для осаждения агрегатов белка в растворе. pH доводили до 3, 5, 7, 9 или 11 путем добавления гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты. pH измеряли с применением калиброванного pH-зонда. Как только раствор достигал заданного значения pH, 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 солибулизировали путем повышения концентрации соли. NaCl добавляли к раствору РМР до достижения им концентрации 1 моль/л. Затем раствор фильтровали с очищением РМР. В качестве альтернативы агрегаты солибулизировали посредством 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 так, как это описано в примере 3.

Пример 3. Определение характеристик пакета-мессенджера растения

В этом примере описано определение характеристик РМР, полученных так, как это 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 гликозилнозитолфосфорилцерамиды (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. Определение характеристик стабильности пакета-мессенджера растений

В этом примере описано 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 сушили 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. Загрузка РМР грузом

В данном примере описаны способы загрузки в РМР малых молекул, белков и нуклеиновых кислот для применения в качестве зондов для определения эффективности поглощения РМР растениями.

а) Загрузка малых молекул в РМР

Получали РМР так, как это описано в примере 1 и примере 2. Для загрузки малых молекул в РМР помещали РМР в раствор PBS с малой молекулой в твердой или солюбилизированной форме. Раствор оставляли на 1 час при 22°C в соответствии с протоколом из Sun, Mol. Ther., 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., 2013. В качестве альтернативы РМР подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды РМР выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 (об./об.) MeOH:CHCl₃ 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). Образцы органической фазы, содержащие липиды РМР, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения РМР, загруженных малыми молекулами, выделенные липиды РМР смешивали с раствором малых молекул и пропускали через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением загруженные РМР очищали посредством способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных малых молекул. Определение характеристик загруженных РМР осуществляли так, как это описано в примере 3, и их стабильность тестировали так, как описано в примере 4.

b) Загрузка белков или пептидов в РМР

Получали РМР так, как это описано в примере 1 и примере 2. Для загрузки белков или пептидов в РМР помещали РМР в раствор с белком или пептидом 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, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в РМР в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 2013. В качестве альтернативы РМР подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды РМР выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 (об./об.) MeOH:CHCl₃ 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). Образцы органической фазы, содержащие липиды РМР, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения РМР, загруженных малыми молекулами, выделенные липиды РМР смешивали с раствором малых молекул и пропускали через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением загруженные РМР очищали посредством способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных пептидов и белка. Определение характеристик загруженных РМР осуществляли так, как это описано в примере 3, и их стабильность тестировали так, как описано в примере 4. Для измерения уровня загрузки белка или пептида, количественный колориметрический анализ пептидов Pierce использовали для небольшого образца загруженных и незагруженных РМР.

c) Загрузка нуклеиновых кислот в РМР

Получали РМР так, как это описано в примере 1 и примере 2. Для загрузки нуклеиновых кислот в РМР помещали РМР в раствор с нуклеиновой кислотой в PBS. Затем раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в РМР в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 2013. В

качестве альтернативы РМР подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды РМР выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 (об./об.) MeOH:CHCl₃ 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). Образцы органической фазы, содержащие липиды РМР, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения РМР, загруженных малыми молекулами, выделенные липиды РМР смешивали с раствором малых молекул и пропускали через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением РМР очищали посредством способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных нуклеиновых кислот. Определение характеристик загруженных РМР осуществляли так, как это описано в примере 3, и их стабильность тестировали так, как описано в примере 4. Нуклеиновые кислоты, загруженные в РМР, количественно определяли с использованием анализа Quant-It от Thermo Fisher в соответствии с инструкциями производителя, либо количественно определяли флуоресценцию с использованием планшет-ридера, если нуклеиновые кислоты метили флуоресцентной меткой.

Пример 6. Повышение поглощения РМР клетками за счет модификации РМР белками, проникающими сквозь клеточную стенку

В этом примере описано повышение клеточного поглощения РМР клетками растений, грибов или бактерий путем модификации РМР целлюлазой для облегчения разрушения компонентов клеточной стенки. В этом примере целлюлазу использовали как модельный фермент, разрушающий клеточную стенку, РМР грейпфрута как модельные РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой гриб, *S. sclerotiorum* как модельный гриб и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

а) Синтез целлюлазо-PEG4-азида

Проводили реакцию целлюлазы (Sigma Aldrich) с NHS-PEG4-азидом (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, то белок растворяли в PBS в концентрации >5 мг/мл, и NHS-PEG4-азид растворяли в объеме DMF, равном 10% объема белка, в 10-кратном молярном избытке по отношению к белку. Затем два раствора смешивали и оставляли на льду на 2 часа. Затем реакцию останавливали добавлением 1 М трис-HCl до конечной концентрации 100 мМ. Пробирку помещали на лед на 15 минут для полной остановки реакции, а затем проводили замену буфера с использованием обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba.

б) Модификация РМР посредством целлюлазы

DSPE-PEG2000-DBCO растворяли в хлороформе, выливали в пробирку и сушили в вакууме до образования тонкой пленки. Затем его ресуспендировали в PBS в 1%, 5%, 10%, 20% и 50% растворах (мас./об.) для получения небольших мицелл. К раствору добавляли эквимольное количество целлюлазо-PEG4-азида. Раствор оставляли для прохождения реакции на 16 часов при 4°C. Затем раствор объединяли с РМР, полученными в примерах 1 и 2, и смешивали посредством экструдера в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015. Таким образом, к РМР прикреплялось достаточное количество целлюлазы для увеличения проникновения через клеточную стенку без увеличения токсичности. В качестве альтернативы использовали другие способы модификации наружной части РМР, как это описано в Spanedda et al., Methods Mol Bio, 2016.

Полученные РМР очищали посредством ультрацентрифугирования или эксклюзионной хроматографии, как это описано в примере 2, и определяли их характеристики и проверяли стабильность с использованием способов, описанных в примере 3 и примере 4. Активность целлюлазы измеряли с использованием набора для флуориметрического анализа активности целлюлазы (Abscam) в соответствии с протоколом производителя.

с) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae целлюлаза-модифицированных РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными целлюлаза-модифицированными РКН26-меченными РМР обрабатывали клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Для определения уровня поглощения РМР клетками *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных целлюлаза-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения целлюлаза-модифицированных GFP-загруженных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

d) Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum целлюлаза-модифицированных РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными целлюлаза-модифицированными РКН26-меченными РМР обрабатывали клетки грибов *S. sclerotiorum*.

Для определения уровня поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (ATCC, № 18687) 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании

исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных целлюлаза-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю клеток *S. Sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения целлюлаза-модифицированных GFP-загруженных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae целлюлаза-модифицированных РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. С целью определения эффективности поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными целлюлаза-модифицированными РМР обрабатывали бактериальные клетки *Pseudomonas syringae*.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных целлюлазой РМР непосредственно на предметном стекле. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Для оценки эффективности поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных целлюлаза-

модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-мечеными РМР процент бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных целлюлаза-модифицированных РМР сравнивали с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-мечеными РМР. Модификация РМР целлюлазой эффективно улучшала клеточное поглощение по сравнению с немодифицированными РМР.

f) Повышенное РМР-поглощение целлюлаза-модифицированных РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения целлюлаза-модифицированных РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., Bioinformatics. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена Arabidopsis Chloroplastos alterados 1 (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для целлюлаза-модифицированных по сравнению с немодифицированными РМР, РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как это описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Затем часть загруженных РМР отбирали в качестве контроля, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Для определения эффективности поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными целлюлаза-модифицированными РМР проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. РМР, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant

Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге-Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных целлюлаза-модифицированных и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных немодифицированных РМР путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными целлюлаза-модифицированными РМР и CLA1-dsRNA-загруженными немодифицированными РМР определяли путем расчета

значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки целлюлаза-модифицированными РМР с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными РМР.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена целлюлаза-модифицированными CLA1-dsRNA-загруженными РМР по сравнению с немодифицированными.

РМР, модифицированные целлюлазой, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с немодифицированными РМР.

Таблица 12. GrCLA1-amiRNA и GrCLA1-DsiRNA

Вид	Название гена	Референтная последовательность	Тип	Название	dsRNA (5'-3')	dsRNA* (5'-3')
Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7 4769_BGI - AD1_v1,0	amiRNA NA	amiRNA_Gh CL-1	UGGCAACAA UAUUUUUGU CUC (SEQ ID NO: 13)	GACAAAAAGA UUGUUGCCAC A (SEQ ID NO: 14)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7 4769_BGI - AD1_v1,0	amiRNA NA	amiRNA_Gh CL-2	UUAGUACCC UGCCUUUGC CAU (SEQ ID NO: 15)	GGCAAAGGAA GGGUACUAAC A (SEQ ID NO: 16)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7 4769_BGI - AD1_v1,0	amiRNA NA	amiRNA_Gh CL-3	UACUUCGUG UGACUUUGC CAC (SEQ ID NO: 17)	GGCAAAGUAA CACGAAGUAC A (SEQ ID NO: 18)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126 00276	amiRNA NA	amiRNA_GrC L-1	UGGCAACAA UAUUUUUGU CUC (SEQ ID NO: 19)	GACAAAAAGA UUGUUGCCAC A (SEQ ID NO: 20)

Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	amiR NA	amiRNA_GrC L-2	UCAGUACCC UGCCUUUGC CAU (SEQ ID NO: 21)	GGCAAAGGAA GGGUACUGAC A(SEQ ID NO: 22)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	amiR NA	amiRNA_GrC L-3	UACUUCGUG UGACUUUGC CAC(SEQ ID NO: 23)	GGCAAAGUAA CACGAAGUAC A(SEQ ID NO: 24)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	amiR NA	amiRNA_Gh CL-4	UUAGUGGCC AUCAACAGG CCG (SEQ ID NO: 25)	GCCUGUUGCU GGCCACU AAC A(SEQ ID NO: 26)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	amiR NA	amiRNA_Gh CL-5	UAUCGAUGU UAGUGGCCA CCU(SEQ ID NO:27)	GUGGCCACGA ACAUCGAUAC A(SEQ ID NO: 28)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	amiR NA	amiRNA_Gh CL-6	UACCGGUAC CCGUUGUUU CAC(SEQ ID NO: 29)	GAAACAACUG GUACCGGUAC A (SEQ ID NO: 30)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	DsiR NA	DsiRNA_GrC L-1	CAGUCCACU UAGUAUCAU CAUCAAG (SEQ ID NO: 31)	CUUGAUGAUG AUACUAAGUG GACUGUG (SEQ ID NO: 32)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	DsiR NA	DsiRNA_GrC L-2	GUCCACUUA GUAUCAUCA UCAAGCA (SEQ ID NO: 33)	UGCUUGAUGA UGAUACUAAG UGGACUG (SEQ ID NO: 34)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	DsiR NA	DsiRNA_GrC L-3	AGUCCACUU AGUAUCAUC AUCAAGC	GCUUGAUGAU GAUACUAAGU

					(SEQ ID NO: 35)	GGACUGU (SEQ ID NO: 36)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	DsiR NA	DsiRNA_GrC L-4	AAUCUUUCA UUGAUUGGA UAGCCTT (SEQ ID NO: 37)	AAGGCUAUCC AAUCA AUGAA AGAUUUA (SEQ ID NO: 38)
Gossypium raimondii	GrCL A1	XM_0126 00276	DsiR NA	DsiRNA_GrC L-5	CAACAACCU UACGAGUAA UAUCACA (SEQ ID NO: 39)	UGUGAUUU ACUCGUAAGG UUGUUGGG (SEQ ID NO: 40)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	DsiR NA	DsiRNA_GhC L-1	CAUCGAUGA UUUAGUUUC UAUUCTC (SEQ ID NO: 41)	GAGAAUAGA AACUAAAUCA UCGAUGUU (SEQ ID NO: 42)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	DsiR NA	DsiRNA_GhC L-2	UCGAUGAUU UAGUUUCUA UUCUCA (SEQ ID NO: 43)	UUGAGAAUA GAAACUAAA CAUCGAUG (SEQ ID NO: 44)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	DsiR NA	DsiRNA_GhC L-3	AUCGAUGAU UUAGUUUCU AUUCUCA (SEQ ID NO: 45)	UGAGAAUAG AAACUAAAUC AUCGAUGU (SEQ ID NO: 46)
Gossypium hirsutum	GhCL A1	GALV010 59036	DsiR NA	DsiRNA_GhC L-4	CGAUGAUUU AGUUUCUAU UCUCAAA (SEQ ID NO: 47)	UUUGAGAAU AGAAACUAAA UCAUCGAU (SEQ ID NO: 48)
Gossypium	GhCL	GALV010	DsiR	DsiRNA_GhC	GAUAUGAUU	UGUCAUUAAG

hirsutum	A1	59036	NA	L-5	GUUAUUCUU AAUGACA (SEQ ID NO: 49)	AAUAACAAUC AUAUCAG (SEQ ID NO: 50)
----------	----	-------	----	-----	--	--

Пример 7. Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с ионными жидкостями

В этом примере описано составление РМР с ионными жидкостями улучшения поглощения РМР за счет улучшенного проникновения в клетки. Ионные жидкости были описаны как потенциальные средства для солюбилизации целлюлозы, основного компонента клеточных стенок, также они могут улучшать проникновение через клеточные стенки грибов или бактерий и/или через клеточную мембрану или внеклеточный матрикс клеток животных. В этом примере ацетат EMIM использовали как модельную ионную жидкость, РМР грейпфрута использовали как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой гриб, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный гриб и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

a) Составление РМР в ионной жидкости

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР ресуспендировали при интенсивном перемешивании в 1%, 5%, 10%, 20%, 50% или 100% растворах ацетата EMIM. В качестве альтернативы использовали ацетат BMIM, ацетат NMIM, ацетат MMIM, ацетат AllylMIM. Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР в ионной жидкости оценивали так, как описано в примере 3 и примере 4.

b) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae составленных в ацетате EMIM РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения RKN26 смешивали с 2 мл 1 mM RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS (контроль) или растворе ацетата EMIM, как это описано в примере 8a. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР в PBS по сравнению с

GFP-загруженными составленными в ацетате EMIM RKN26-мечеными РМР, обрабатывали клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстрозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *S. cerevisiae*, дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР в PBS или ацетате EMIM непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в ацетате EMIM РМР по сравнению с составленными в PBS GFP-загруженными РМР, процентную долю дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем RKN26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в ацетате EMIM РМР сравнивали с составленными в PBS GFP-загруженными РМР.

с) Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum составленных в ацетате EMIM РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 mM RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными составленными в ацетате EMIM RKN26-мечеными РМР, обрабатывали клетки грибов *S. sclerotiorum*

Чтобы определить уровень поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (АТСС, №18687), 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных РМР, составленных в ацетате ЕМІМ, или РМР, составленных в PBS, непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в ацетате ЕМІМ РМР по сравнению с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS, процентную долю клеток *S. sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали с клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в ацетате ЕМІМ РМР сравнивали с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS.

d) Повышенное РМР-поглощение клетками MDA-MB-231 составленных в ацетате ЕМІМ РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР, составленных в PBS, по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-мечеными составленными в ацетате ЕМІМ РМР, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из АТСС (НТВ-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на

лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ РМР, составленных в PBS и составленных в ацетате ЕМІМ, непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления РМР из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40х увеличении для определения эффективности поглощения. Захват РМР клетками рака молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ составленных в ацетате ЕМІМ РМР по сравнению с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в ацетате ЕМІМ РМР сравнивали с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae составленных в ацетате ЕМІМ РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Модифицированные РМР и РМР, составленные в PBS, загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS (контроль) или растворе ацетата ЕМІМ, как это описано в примере 8а. Чтобы определить эффективность

поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР, составленных в PBS, по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными составленными в ацетате ЕМІМ РМР, бактериальные клетки *Pseudomonas syringae* подвергали обработке.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл составленных в PBS РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ РМР и РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ РМР, составленных в ацетате ЕМІМ, непосредственно на предметном стекле. В дополнение к PBS-контролю бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), 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. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных составленных в ацетате ЕМІМ РМР по сравнению с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР, процентную долю бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР, составленных в ацетате ЕМІМ, сравнивали с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР. Составление РМР в ацетате ЕМІМ улучшало эффективность клеточного поглощения по сравнению с РМР, составленными в PBS.

f) Повышенное РМР-поглощение составленных в ацетате ЕМІМ РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения РМР, составленных в ацетате ЕМІМ, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., *Bioinformatics*. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилозулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена *Arabidopsis Chloroplastos alterados 1* (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли

посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Часть загруженных РМР составляли в PBS, а остальную часть модифицировали целлюлазой так, как описано в примере 8b.

РМР, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде (ddH₂O) до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Чтобы определить эффективность поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными составленными в ацетате EMIM РМР, проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5x минеральные соли Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1x витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в ацетате EMIM, и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в PBS, путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР с эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в ацетате EMIM, и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в VIB (пример 1), вводили вручную с нижней части семядолей через участки ран, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в

соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScript™ First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными PMP, составленными в ацетате EMIM, и CLA1-dsRNA-загруженными PMP, составленными в PBS, определяли путем расчета значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки PMP, составленными в ацетате EMIM, с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки PMP, составленными в PBS.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья растений, обработанных PMP, составленными в ацетате EMIM, и PMP, составленными в PBS, фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA-загруженными PMP, составленными в ацетате EMIM, по сравнению с составленными в PBS.

PMP, составленные в ацетате EMIM, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с PMP, составленными в PBS.

Пример 8. Повышение поглощения PMP клетками за счет составления PMP с жидкостями на основе фтористого соединения

В этом примере описано составление PMP с жидкостями на основе фтористого соединения для улучшения поглощения PMP за счет улучшенного проникновения в клетки. Жидкости на основе фтористого соединения были описаны как потенциальные средства для солубилизации целлюлозы, основного компонента клеточных стенок, также они могут улучшать проникновение через клеточные стенки грибов или бактерий и/или через клеточную мембрану или внеклеточный матрикс клеток животных. В данном примере перфтороктан использовали как модельную жидкость на основе фтористого

соединения, РМР грейпфрута использовали как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой гриб, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный гриб и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

а) Составление РМР в жидкости на основе фтористого соединения

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР ресуспендировали при интенсивном перемешивании в 1%, 5%, 10%, 20%, 50% или 100% растворах перфтороктана (Sigma Aldrich). В качестве альтернативы можно использовать перфторгексан или перфтор(метилдекалин). Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР в жидкости на основе фтористого соединения оценивали так, как описано в примере 3 и примере 4.

б) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae составленных в перфтороктане РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения RKN26 смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS (контроль) или растворе перфтороктана, как это описано в примере 8а. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР в PBS по сравнению с GFP-загруженными составленными в перфтороктане RKN26-меченными РМР, обрабатывали клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстрозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *S. cerevisiae*, дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР в PBS или перфтороктане непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в

цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в перфтороктане РМР по сравнению с составленными в PBS GFP-загруженными РМР, процентную долю дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем RKN26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в перфтороктане РМР сравнивали с составленными в PBS GFP-загруженными РМР.

с) Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum составленных в перфтороктане РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали целлюлазой так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными составленными в перфтороктане RKN26-меченными РМР, обрабатывали клетки грибов *S. sclerotiorum*.

Чтобы определить уровень поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (ATCC, №18687), 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных РМР, составленных в перфтороктане, или РМР, составленных в PBS, непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в перфтороктане РМР по сравнению с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS, процентную долю клеток *S. sclerotiorum* с

зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем PKH26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в перфтороктане РМР сравнивали с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS.

d) Повышенное РМР-поглощение клетками MDA-MB-231 составленных в перфтороктане РМР грейпфрута, загруженных кальцеином AM

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином AM (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин AM является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем PKH26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином AM, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ PKH26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином AM PKH26-меченных РМР, составленных в PBS, по сравнению с загруженными кальцеином AM PKH26-меченными составленными в перфтороктане РМР, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из ATCC (HTB-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл PKH26-меченных загруженных кальцеином AM РМР, составленных в PBS и составленных в перфтороктане, непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина AM (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя PKH26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления РМР из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40x увеличении для определения эффективности поглощения. Захват РМР клетками рака

молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ составленных в перфтороктане РМР по сравнению с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных составленных в перфтороктане РМР сравнивали с GFP-загруженными РМР, составленными в PBS.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae составленных в перфтороктане РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Модифицированные РМР и РМР, составленные в PBS, загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS (контроль) или растворе перфтороктана, как это описано в примере 8а. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР, составленных в PBS, по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными составленными в перфтороктане РМР, обрабатывали бактериальные клетки *Pseudomonas syringae*.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из ATCC (BAA-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл составленных в PBS РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ РМР и РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ РМР, составленных в перфтороктане, непосредственно на предметном стекле. В дополнение к PBS-контролю бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), 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. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных составленных в перфтороктане РМР по сравнению с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР, процентную долю бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения среднего красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР, составленных в перфтороктане, сравнивали с составленными в PBS загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР. Составление РМР в перфтороктане улучшает эффективность их поглощения клетками по сравнению с РМР, составленными в PBS.

f) Повышенное РМР-поглощение составленных в перфтороктане РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения составленных в перфтороктане РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., Bioinformatics. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена Arabidopsis Chloroplastos alterados 1 (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Часть загруженных РМР составляли в PBS, а остальную часть модифицировали целлюлазой так, как описано в примере 8b.

РМР, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде (ddH₂O) до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Чтобы определить эффективность поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными составленными в перфтороктане РМР, проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant

Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распутившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой, и обрабатывали эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в перфтороктане, и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в PBS, путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР с эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в перфтороктане, и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных РМР, составленных в VIB (пример 1), вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего

контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными РМР, составленными в перфтороктане, и CLA1-dsRNA-загруженными РМР, составленными в PBS, определяли путем расчета значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки РМР, составленными в перфтороктане, с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки РМР, составленными в PBS.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья растений, обработанных РМР, составленными в перфтороктане, и РМР, составленными в PBS, фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA-загруженными РМР, составленными в перфтороктане, по сравнению с составленными в PBS.

РМР, составленные в перфтороктане, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с РМР, составленными в PBS.

Пример 9. Повышение поглощения РМР за счет составления РМР с детергентами, предназначенными для улучшения проникновения в клетку

В этом примере описано повышение клеточного поглощения РМР клетками животных, растений, грибов или бактерий путем модификации РМР детергентами, предназначенными для облегчения проникновения через клеточные мембраны. В этом примере сапонин использовали как модельный детергент, РМР грейпфрута как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой грибок, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный грибок и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

а) Модификация РМР сапонином

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР ресуспендировали при энергичном перемешивании в 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% мас./об. растворах сапонины (*Avanti Polar Lipids*). В качестве альтернативы использовали CHAPS. Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР, модифицированных сапонином, оценивали так, как это описано в примере 3 и примере 4.

*б) Повышенное РМР-поглощение клетками *Saccharomyces cerevisiae* модифицированных сапонином РМР грейпфрута, загруженных белком GFP*

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и

загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали сапонином так, как это описано в примере 9а. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными сапонином РКН26-мечеными РМР, клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* подвергали обработке.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстрозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Для определения уровня поглощения РМР клетками *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных сапонином РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР, процент дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных сапонином РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

с) *Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum модифицированных сапонином РМР грейпфрута, загруженных белком GFP*

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в

качестве контролей, а остальные модифицировали сапонином так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными сапонином РКН26-меченными РМР, клетки грибов *S. sclerotiorum* подвергали обработке.

Для определения уровня поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (ATCC, № 18687) 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных сапонином РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР, процентную долю клеток *S. sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных сапонином РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

d) Повышенное РМР-поглощение клетками MDA-MB-231 модифицированных сапонином РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали сапонином так, как это описано в примере 6b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma)

в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мкг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными модифицированными сапонином РМР, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из ATCC (HTB-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных сапонином РМР непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления РМР из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40х увеличении для определения эффективности поглощения. Захват РМР клетками рака молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ модифицированных сапонином РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных сапонином РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae

модифицированных сапонином РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали сапонином так, как это описано в примере 9b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными модифицированными сапонином РМР, бактериальные клетки *Pseudomonas syringae* подвергали обработке.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных сапонином РМР непосредственно на предметном стекле. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных сапонином РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР, процентную долю бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных сапонином РМР сравнивали с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР. Модификация РМР сапонином эффективно улучшала клеточное поглощение по сравнению с немодифицированными РМР.

г) Повышенное РМР-поглощение модифицированных сапонином РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения модифицированных сапонином РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., Bioinformatics. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена Arabidopsis Chloroplastos alterados 1 (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для модифицированных сапонином по сравнению с немодифицированными РМР, РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как это описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Затем часть загруженных РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали сапонином так, как это описано в примере 9б. Для определения эффективности поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными модифицированными сапонином РМР проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. РМР, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных модифицированных сапонином РМР и 0

(ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных немодифицированных РМР, путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными модифицированными сапонином РМР и CLA1-dsRNA-загруженными немодифицированными РМР определяли путем расчета значения $\Delta\Delta C_t$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки модифицированными сапонином РМР с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными РМР.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена модифицированными сапонином CLA1-dsRNA-загруженными РМР по сравнению с немодифицированными.

РМР, модифицированные сапонином, более эффективно поглощались

растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с немодифицированными РМР.

Пример 10. Повышение поглощения РМР клетками за счет составления РМР с цвиттер-ионными липидами

В этом примере описано повышение клеточного поглощения РМР клетками животных, растений, грибов или бактерий путем модификации РМР цвиттер-ионными липидами для облегчения проникновения через клеточную стенку и/или клеточную мембрану. В этом примере 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC) использовали как модельный цвиттер-ионный липид, РМР грейпфрута как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой гриб, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный гриб и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

а) Модификация РМР посредством DOPC

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР ресуспендировали при энергичном перемешивании в 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% мас./об. растворах DOPC (Avanti Polar Lipids). В качестве альтернативы использовали DEPC. Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР, модифицированных DOPC, оценивали так, как это описано в примере 3 и примере 4.

б) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae модифицированных посредством РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством DOPC так, как это описано в примере 10b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения RKN26 смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными DOPC-модифицированными RKN26-меченными РМР, клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* подвергали обработке.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано

производителем. Для определения уровня поглощения РМР клетками *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD_{600} 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных DOPC-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР, процент дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных DOPC-модифицированных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

с) Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum модифицированных посредством DOPC РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством DOPC так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными DOPC-модифицированными РКН26-мечеными РМР, клетки грибов *S. sclerotiorum* подвергали обработке.

Для определения уровня поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (АТСС, № 18687) 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или

немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Чтобы оценить эффективность поглощения GFP-загруженных DOPC-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР, процентную долю клеток *S. sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем RKN26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных DOPC-модифицированных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

d) *Повышенное РМР-поглощение* клетками MDA-MB-231 *модифицированных посредством DOPC РМР грейпфрута, загруженных кальцеином AM*

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством DOPC так, как это описано в примере 6b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином AM (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин AM является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином AM, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином AM RKN26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином AM RKN26-меченными DOPC-модифицированными РМР, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из АТСС (НТВ-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием

Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и DOPC-модифицированных РМР непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления РМР из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40х увеличении для определения эффективности поглощения. Захват РМР клетками рака молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ DAB-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных DOPC-модифицированных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae модифицированных посредством DOPC РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством DOPC так, как это описано в примере 10b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными

кальцеином АМ РКН26-меченными DOPC-модифицированными РМР, бактериальные клетки *Pseudomonas syringae* подвергали обработке.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и DOPC-модифицированных РМР непосредственно на предметном стекле. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных DOPC-модифицированных РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР, процентную долю бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных DOPC-модифицированных РМР сравнивали с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР. Модификация РМР посредством DOPC эффективно улучшала клеточное поглощение по сравнению с немодифицированными РМР.

г) Повышенное РМР-поглощение модифицированных посредством DOPC РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения DOPC-модифицированных РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., *Bioinformatics*. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена *Arabidopsis Chloroplastos alterados 1* (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для DOPC-модифицированных по сравнению с немодифицированными РМР, РМР грейпфрута загружали дуплексами

GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как это описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в PMP измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Затем часть загруженных PMP отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством DOPC так, как это описано в примере 10b. Для определения эффективности поглощения PMP для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных PMP по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными DOPC-модифицированными PMP проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. PMP, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки PMP.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой, составляющей 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных модифицированных посредством DOPC PMP и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных немодифицированных PMP, путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой PMP нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы PMP вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг

общей ПНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными DOPC-модифицированными РМР и CLA1-dsRNA-загруженными немодифицированными РМР определяли путем расчета значения $\Delta\Delta C_t$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки DOPC-модифицированными РМР с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными РМР.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена DOPC-модифицированными CLA1-dsRNA-загруженными РМР по сравнению с немодифицированными.

РМР, модифицированные сапонином, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с немодифицированными РМР.

Пример 11. Повышение поглощения РМР клетками посредством составления РМР с ионизируемыми липидами

В этом примере описано повышение клеточного поглощения РМР клетками животных, растений, грибов или бактерий путем модификации РМР ионизируемыми липидами для облегчения проникновения через клеточную стенку и/или клеточную мембрану. В этом примере 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азанедиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200) использовали как модельный ионизируемый липид, РМР грейпфрута как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой гриб, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный гриб и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

a) Модификация РМР посредством C12-200

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. C12-200 (ионизируемые липиды) получали в соответствии с протоколом синтеза, описанным в Love PNAS 2010. РМР ресуспендировали при энергичном перемешивании в 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% мас./об. растворах C12-200 (Avanti Polar Lipids). Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР, модифицированных посредством C12-200, оценивали так, как это описано в примере 3 и примере 4.

b) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae модифицированных посредством C12-200 РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством C12-200 так, как это описано в примере 11b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения RKN26 смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными с помощью C12-200 RKN26-меченными РМР обрабатывали клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстрозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Для определения уровня поглощения РМР клетками *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных

модифицированных посредством C12-200 РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали с клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных посредством C12-200 РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

с) Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum модифицированных посредством C12-200 РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством C12-200 так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных РКН26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными посредством C12-200 РКН26-меченными РМР обрабатывали клетки грибов *S. sclerotiorum*.

Для определения уровня поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (ATCC, № 18687) 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* 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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных модифицированных посредством C12-200 РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю клеток *S. sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали с клетками, обработанными РМР, и

контролями, обработанными только PBS и красителем PKH26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных посредством C12-200 PMP сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными PMP.

d) Повышенное PMP-поглощение клетками MDA-MB-231 модифицированных посредством C12-200 PMP грейпфрута, загруженных кальцеином AM

PMP получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из PMP отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством C12-200 так, как это описано в примере 6b. Модифицированные и немодифицированные PMP загружали кальцеином AM (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015.. Кальцеин AM является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован PMP, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы PMP метили липофильным мембранным красителем PKH26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг PMP, загруженных кальцеином AM, в 1 мл разбавленного C смешивали с 2 мл 1 мМ PKH26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и PMP концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. С целью определения эффективности поглощения PMP для загруженных кальцеином AM PKH26-меченных PMP по сравнению с загруженными кальцеином AM PKH26-меченными модифицированными посредством C12-200 PMP, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из ATCC (HTB-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения PMP клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл PKH26-меченных загруженных кальцеином AM немодифицированных и модифицированных посредством C12-200 PMP непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина AM (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя PKH26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных PMP. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления PMP из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40x увеличении для определения эффективности поглощения. Захват PMP клетками рака

молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ модифицированных посредством С12-200 РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения GFP-загруженных модифицированных посредством С12-200 РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae модифицированных посредством С12-200 РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством С12-200 так, как это описано в примере 11b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. С целью определения эффективности поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными модифицированными посредством С12-200 РМР, обрабатывали бактериальные клетки *Pseudomonas syringae*.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных посредством С12-200 РМР непосредственно на предметном стекле. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26

(конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Для оценки эффективности поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных посредством С12-200 РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-мечеными РМР процент бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных посредством С12-200 РМР сравнивали с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-мечеными РМР. Модификация РМР посредством С12-200 эффективно улучшала клеточное поглощение по сравнению с немодифицированными РМР.

г) Повышенное РМР-поглощение модифицированных посредством С12-200 РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения модифицированных посредством С12-200 РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., Bioinformatics. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена Arabidopsis Chloroplastos alterados 1 (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для модифицированных посредством С12-200 по сравнению с немодифицированными РМР, РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как это описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Затем часть загруженных РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали посредством С12-200 так, как это описано в примере 11b. Для определения эффективности поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными модифицированными посредством С12-200 РМР проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. РМР, загруженные

amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге-Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных модифицированных посредством C12-200 и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных немодифицированных РМР путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей

программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными модифицированными посредством C12-200 РМР и CLA1-dsRNA-загруженными немодифицированными РМР определяли путем расчета значения $\Delta\Delta Ct$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки модифицированными посредством C12-200 РМР с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными РМР.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена модифицированными посредством C12-200 CLA1-dsRNA-загруженными РМР по сравнению с немодифицированными.

РМР, модифицированные катионным липидом, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с немодифицированными РМР.

Пример 12. Повышение поглощения РМР клетками посредством составления РМР с катионными липидами

В этом примере описано повышение клеточного поглощения РМР клетками животных, растений, грибов или бактерий путем модификации РМР катионными липидами для облегчения проникновения через клеточную стенку и/или клеточную мембрану. В этом примере РМР грейпфрута использовали как модельный РМР, хлопчатник как модельное растение, *Saccharomyces cerevisiae* как модельный дрожжевой грибок, MDA-MB-231 как модельную линию клеток человека, *S. sclerotiorum* как модельный грибок и *Pseudomonas syringae* как модельную бактерию.

Протокол эксперимента

а) Модификация РМР катионным липидом

Концентрированный раствор РМР грейпфрута выделяли так, как это описано в примере 1 и примере 2. РМР ресуспендировали при энергичном перемешивании в 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% мас./об. растворах катионного липида (Avanti Polar Lipids). Концентрацию РМР определяли исходя из предположения о 100% извлечении из суспензии и умножая концентрацию перед составлением на соотношение объемов. Характеристики и стабильность РМР, модифицированных катионным липидом, оценивали так, как это описано в примере 3 и примере 4.

б) Повышенное РМР-поглощение клетками Saccharomyces cerevisiae модифицированных катионным липидом РМР грейпфрута, загруженных белком GFP

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали катионным липидом так, как это описано в примере 12b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С из набора для мечения RKN26 смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными катионным липидом RKN26-меченными РМР, обрабатывали клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae получали из ATCC (№ 9763) и поддерживали культуру при 30°C в пептонно-декстозном бульоне с дрожжевым экстрактом (YPD), как указано производителем. Для определения уровня поглощения РМР клетками *S. cerevisiae* дрожжевые клетки выращивали до OD₆₀₀ 0,4-0,6 в селективной среде и инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных модифицированных катионным липидом РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю дрожжевых клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем RKN26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения модифицированных катионным липидом, GFP-загруженных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

с) *Повышенное РМР-поглощение клетками S. sclerotiorum модифицированных катионным липидом РМР грейпфрута, загруженных белком GFP*

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2, и

загружали белком GFP, как это описано в примере 5. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали катионным липидом так, как это описано в примере 6b. Инкапсулирование GFP в РМР измеряли посредством вестерн-блоттинга или флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем RKN26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ RKN26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали с использованием способов, описанных в примере 2, а меченые гранулы РМР ресуспендировали в PBS. С целью определения эффективности поглощения РМР для GFP-загруженных RKN26-меченных РМР по сравнению с GFP-загруженными модифицированными катионным липидом RKN26-меченными РМР обрабатывали клетки грибов *S. sclerotiorum*.

Для определения уровня поглощения РМР аскоспорами *S. sclerotiorum* (ATCC, № 18687) 10000 аскоспор инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл RKN26-меченных GFP-загруженных модифицированных РМР или немодифицированных РМР непосредственно на предметных стеклах. В дополнение к PBS-контролю клетки *S. sclerotiorum* инкубировали в присутствии красителя RKN26 (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. Захват РМР дрожжевыми клетками наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых GFP-загруженных РМР в цитоплазме или если цитоплазма дрожжевых клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем RKN26. Для оценки эффективности поглощения GFP-загруженных модифицированных катионным липидом РМР по сравнению с немодифицированными GFP-загруженными РМР процентную долю дрожжевых клеток *S. sclerotiorum* с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем RKN26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения модифицированных катионным липидом, GFP-загруженных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

d) Повышенное РМР-поглощение клетками MDA-MB-231 модифицированных катионным липидом РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали катионным липидом так, как это описано в примере 6b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в

примере 5 и в [Gray et al., MethodsX 2015](#). Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. С целью определения эффективности поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными модифицированными катионным липидом РМР, обрабатывали клетки рака молочной железы человека.

Линию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 получали из АТСС (НТВ-26), и выращивали, и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки с конфлюентностью 70-80% собирали, подсчитывали и высевали в 96-луночный культуральный планшет с обработанными лунками с плотностью посева 10000 клеток на лунку в 200 мкл среды для культивирования клеток. Клеткам позволяли прикрепиться в течение 3 часов, затем среду удаляли, клетки промывали один раз с использованием Dulbecco PBS и добавляли среду без FCS для того, чтобы клетки культивировались без сыворотки в течение 3 часов до обработки. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками рака молочной железы, клетки инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных катионным липидом РМР непосредственно в лунке. В дополнение к PBS-контролю клетки инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 30 мин., 1 ч., 2 ч. и 4 ч. при 37°C клетки промывали 4×10 мин. PBS для удаления РМР из среды. Затем получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения (EVOS2 FL) при 40х увеличении для определения эффективности поглощения. Захват РМР клетками рака молочной железы наблюдался в случае выявления красных мембран и зеленых загруженных кальцеином АМ РМР в цитоплазме или если цитоплазма клеток становилась красной и/или зеленой по сравнению с клетками при окрашивании исключительно клеточной мембраны красителем РКН26. Чтобы оценить эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ модифицированных катионным липидом РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РМР, процентную долю клеток с зеленой цитоплазмой/зелеными РМР в цитоплазме по сравнению с клетками с окрашиванием только мембраны сравнивали между клетками, обработанными РМР, и контролями, обработанными только PBS и красителем РКН26. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием

программного обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения модифицированных катионным липидом, GFP-загруженных РМР сравнивали с немодифицированными GFP-загруженными РМР.

е) Повышенное РМР-поглощение клетками Pseudomonas syringae модифицированных катионным липидом РМР грейпфрута, загруженных кальцеином АМ

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Некоторые из РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали катионным липидом так, как это описано в примере 12b. Модифицированные и немодифицированные РМР загружали кальцеином АМ (Sigma Aldrich), как это описано в примере 5 и в Gray et al., MethodsX 2015. Кальцеин АМ является флуоресцентным только тогда, когда он инкапсулирован РМР, а инкапсуляцию измеряли по флуоресценции. Затем все составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН26 красным (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 50 мг РМР, загруженных кальцеином АМ, в 1 мл разбавленного С из набора для мечения РКН26 смешивали с 2 мл 1 мМ РКН26 и инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл 1% BSA. Весь немеченый краситель смывали и РМР концентрировали с использованием фильтра Amicon 100 кДа, как описано в примере 2. С целью определения эффективности поглощения РМР для загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных РМР по сравнению с загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными модифицированными катионным липидом РМР, обрабатывали бактериальные клетки *Pseudomonas syringae*.

Бактерии *Pseudomonas syringae* получали из АТСС (ВАА-871) и выращивали на агаре В Кинга в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить уровень поглощения РМР клетками *P. syringae*, 10 мкл из 1 мл бактериальной суспензии, полученной в течение ночи, инкубировали с 0 (отрицательный контроль), 1, 10 или 50, 100 и 250 мкг/мл РКН26-меченных загруженных кальцеином АМ немодифицированных и модифицированных катионным липидом РМР непосредственно на предметном стекле. В дополнение к контролю, представляющему собой воду, бактерии *P. syringae* инкубировали в присутствии кальцеина АМ (конечная концентрация 5 мкг/мл), красителя РКН26 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и немодифицированных РМР. После инкубации в течение 5 мин., 30 мин. и 1 ч. при комнатной температуре получали изображения на флуоресцентном микроскопе высокого разрешения. Для оценки эффективности поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных катионным липидом РМР по сравнению с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР, процент бактериальных клеток с зеленой цитоплазмой или зелеными и 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. Величину поглощения в каждой клетке количественно оценивали путем измерения средней интенсивности красного и зеленого сигнала флуоресценции от клетки с использованием программного

обеспечения ImageJ, а эффективность поглощения загруженных кальцеином АМ РКН26-меченных модифицированных катионным липидом РМР сравнивали с немодифицированными загруженными кальцеином АМ РКН26-меченными РМР. Модификация РМР катионным липидом эффективно улучшала клеточное поглощение по сравнению с немодифицированными РМР.

г) Повышенное РМР-поглощение модифицированных катионным липидом РМР грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Чтобы продемонстрировать повышение клеточного поглощения модифицированных катионным липидом РМР, РМР грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием сайта Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; Fahlgren et al., Bioinformatics. 32(1):157-158, 2016)) или изготовленной на заказ дайсер-субстратной siRNA (DsiRNA, разработанной IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза у хлопчатника GrCLA1 (1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза). GrCLA1 является геном-гомологом гена Arabidopsis Chloroplastos alterados 1 (AtCLA1), потеря функции которого приводит к фенотипу альбиносов на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

РМР получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы определить эффективность поглощения РМР для модифицированных катионным липидом по сравнению с немодифицированными РМР, РМР грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 12), как это описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в РМР измеряли посредством набора для анализа Quant-It RiboGreen RNA или с использованием контрольных меченных флуоресцентным красителем amiRNA или DsiRNA (IDT). Затем часть загруженных РМР отбирали в качестве контролей, а остальные модифицировали катионным липидом так, как это описано в примере 12b. Для определения эффективности поглощения РМР для CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженных РМР по сравнению с CLA1-amiRNA/DsiRNA-загруженными модифицированными катионным липидом РМР, проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. РМР, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемые dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает эквивалент эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл, в стерильной воде.

Семена хлопчатника (*Gossypium hirsutum* и *Gossypium raimondii*) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ м⁻² с⁻¹, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч.) при дневных/ночных температурах 26/20°C. Через 4 дня проростки с полностью

распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки РМР.

Семидневные проростки хлопчатника переносили на 0,5х минеральные соли Мурасиге-Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1х витаминами MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (мас./об.) агарозой и обрабатывали эффективной дозой 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных модифицированных катионным липидом РМР и 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл GrCLA1-dsRNA-загруженных немодифицированных РМР путем опрыскивания всего проростка, 1 мл раствора на растение, по 3 растения на группу. В качестве альтернативы перед обработкой РМР нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника протыкали иглой 25 G без прокалывания семядолей. Растворы РМР вводили вручную с нижней части семядолей через участки повреждений, используя безыгольный шприц объемом 1 мл. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч./8 ч.) при интенсивности света 90 мкмоль м⁻² с⁻¹ и дневных/ночных температурах 26/20°C.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной mRNA CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и тщательно обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Promega). кДНК первой нити синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием системы SuperScriptTM First-Strand Synthesis (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 7), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 8) и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) и 18s RNA_F 5'-TCTGCCSTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 11), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 12) с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 сек., 55°C в течение 30 сек; и 72°C в течение 30 сек. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки CLA1-dsRNA-загруженными модифицированными катионным липидом РМР и CLA1-dsRNA-загруженными немодифицированными РМР определяли путем расчета значения $\Delta\Delta C_t$, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки модифицированными катионным липидом РМР с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными РМР.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1-dsRNA оценивали посредством фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и использовали программное обеспечение ImageJ

для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и оценивали эффективность сайленсинга гена модифицированными катионным липидом CLA1-dsRNA-загруженными РМР по сравнению с немодифицированными.

РМР, модифицированные катионным липидом, более эффективно поглощались растительными клетками и индуцировали более сильный сайленсинг гена CLA1 по сравнению с немодифицированными РМР.

Пример 13. Модификация РМР с использованием катионных липидов

В этом примере показана способность изменять поверхностный заряд, увеличивать емкость загрузки и увеличивать клеточное поглощение РМР в клетках человека и растений путем модификации РМР катионными липидами. В этом примере DOTAP (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан) и DC-холестерин (3 β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин) использовали как модельные катионные липиды, РМР грейпфрута и лимона как модельные РМР, siRNA/транс-активирующую РНК CRISPR (tracrRNA) как модельную отрицательно заряженную нагрузку, COLO679 как модельную линию клеток человека и Black Mexican sweet (BMS) Zea mays (кукуруза) как модельную линию клеток растения.

Протокол эксперимента

а) Получение РМР из лимона/грейпфрута

Красные органические грейпфруты или желтые органические лимоны приобретали в местном продуктовом магазине. Шесть литров грейпфрутового сока собирали с помощью соковыжималки, pH доводили до pH 4 с использованием NaOH, инкубировали с 1 ЕД./мл пектиназы (Sigma, 17389) для удаления контаминантов, представляющих собой пектин, а 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, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,7 в течение 30 минут для 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 до 10x с последующей диафильтрацией в 10 диафильтрационных объемах PBS и дополнительно концентрировали до конечной концентрации 120 мл (50x). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию (SEC), чтобы элюировать фракции, содержащие РМР, которые анализировали по оптической плотности при 280 нм (SpectraMax®) и концентрации белка (BCA-анализ белка Pierce™) для подтверждения фракций, содержащих РМР, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Полученные в ходе SEC фракции 3-7, содержащие 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 40000x 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 размер РМР (70,3 нм +/- 12,4 нм SD) определяли посредством NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем. Полученные РМР грейпфрута (GF) или лимона (LM) использовали для экстракции липидов с использованием способа Блая-Дайера, как описано ниже.

б) Модификация РМР посредством катионных липидов

Для получения РМР с восстановленными липидами (LPMP) проводили экстракцию общих липидов из концентрированного раствора РМР грейпфрута или лимона с использованием способа Блая-Дайера. (Bligh and Dyer, J Biolchem Physiol, 37: 911-917, 1959). Если вкратце, то 1 мл концентрированных РМР (10^{12} - 10^{13} РМР/мл) смешивали с 3,5 мл смеси хлороформ:метанол (1:2, об./об.) и хорошо встряхивали. Затем добавляли 1,25 мл хлороформа и встряхивали с последующим перемешиванием с 1,25 мл стерильной воды. И наконец, смесь центрифугировали при 300 g в течение 5 минут при комнатной температуре. Нижнюю органическую фазу, содержащую липиды, извлекали и сушили с использованием системы TurboVar® (Biotage®). Для изменения липидного состава природных LPMP синтетические катионные липиды (DOTAP, DC-холестерин) растворяли в смеси хлороформ:метанол (9:1) и добавляли к экстрагированным липидам РМР до количества 25% или 40% (мас./мас.) от общих липидов с последующим энергичным перемешиванием. Высушенную липидную пленку получали при испарении растворителя в потоке инертного газа (например, азота) или при испарении с использованием системы TurboVar® (фиг. 1). Для получения восстановленных РМР из экстрагированных липидов добавляли воду или буфер (например, PBS) к высушенной липидной пленке и оставляли на 1 ч. при комнатной температуре для гидратации. Образованные липидные частицы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания или обработке ультразвуком (ультразвуковая ванна Branson 2800, 10 мин., комнатная температура). Затем, чтобы уменьшить количество липидных бислоев и общий размер частиц, липидные РМР экстрагировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids) (фиг. 1). Если требовался концентрированный LPMP, образцы концентрировали ультрацентрифугированием при 100000 x g в течение 30 мин. при 4°C. Конечный осадок ресуспендировали в стерильной воде UltraPure или в PBS и хранили при 4°C до дальнейшего применения. Конечную концентрацию LPMP и медианный размер LPMP (в диапазоне 89-104 нм) определяли посредством NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем. Поверхностный заряд (дзета-потенциал) измеряли посредством динамического рассеяния света с использованием Zetasizer (Malvern Panalytical) (фиг. 4A). Диапазон размера и концентраций LPMP составлял 83 ± 19 нм и

$1,7 \times 10^{12}$ LPMP/мл для LM LPMP, 106 ± 25 нм и $6,54 \times 10^{10}$ LPMP/мл для LPMP, модифицированных посредством DOTAP, и 91 ± 17 нм и $3,08 \times 10^{11}$ LPMP/мл для PMP, модифицированных посредством DC-холестерина (фиг. 2). Модификация LPMP посредством катионных липидов DOTAP и DC-холестерина изменяла поверхностный заряд LPMP: с увеличением содержания катионных липидов поверхностный заряд LPMP увеличивался (фиг. 4А). Анализ полученных посредством криоэлектронной микроскопии изображений LPMP, восстановленных из экстрагированных липидов лимона, подтвердил сферичность LPMP и распределение частиц по размерам ($68,7 \pm 23$ нм (стандартное отклонение)) (фиг. 3А и 3В).

с) Загрузка модифицированных катионным липидом PMP отрицательно заряженным грузом

Для загрузки siRNA/tracrRNA в экстрагированные липиды GF или LM добавляли катионные липиды и сушили так, как это описано выше. siRNA/tracrRNA, растворенную в воде, свободной от нуклеаз, или в двухфазном буфере (IDT®), добавляли к высушенной липидной пленке при концентрации 1,5 нмоль на 1 мг липидов PMP и оставляли на 1 ч. при комнатной температуре для гидратации. Образованные липидные частицы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания и экструдировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids) (фиг. 1). Загруженные PMP подвергали диализу в течение ночи против PBS в диализаторе (Spectrum®) с мембраной MWCO 100 кДа, а затем стерилизовали с использованием фильтров из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,2 мкм. Дополнительно образцы очищали и концентрировали с использованием ультрацентрифугирования. Нагруженные PMP центрифугировали в течение 30 мин. при $100000 \times g$ при 4°C , супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 1 мл PBS и концентрировали при $100000 \times g$ в течение 30 минут. Полученный осадок ресуспендировали либо в PBS (для клеточного поглощения клетками человека), либо в воде (для клеточного поглощения клетками растений). Размер РНК-загруженных LPMP и количество частиц оценивали посредством NanoFCM: средний размер и концентрация частиц составляли 89 ± 15 нм и $1,54 \times 10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP, 104 ± 25 нм и $2,54 \times 10^{11}$ LPMP/мл для DC-холест. и 100 ± 30 нм и $9,7 \times 10^{11}$ LPMP/мл для DOTAP. Загрузку РНК определяли посредством анализа Quant-iT™ RiboGreen™ или путем измерения интенсивности флуоресценции меченого груза (siRNA, меченной Alexa Fluor 555 или tracrRNA, меченной АТТО 550). Анализ RiboGreen™ выполняли согласно протоколу производителя в присутствии гепарина (5 мг/мл) и 1% Triton-X100 для лизиса PMP и высвобождения инкапсулированного груза. Модификация LPMP катионными липидами DOTAP и DC-холестерином изменила поверхностный заряд LPMP и повысила загрузку отрицательно заряженного груза (например, РНК) по сравнению с LPMP без катионных липидов (фиг. 4А - 4D).

d) Повышенное поглощение PMP, модифицированных посредством DOTAP, клетками человека (COLO679)

Модифицированные липидами РМР (LPMP) из грейпфрута с добавлением DOTAP (20%, мас./мас.) получали так, как это описано выше. Затем составы РМР метили липофильным мембранным красителем РКН67 зеленым (Sigma) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми его модификациями. Если вкратце, то 300 мкл LPMP (приблизительно 1×10^{12} РМР/мл) смешивали при соотношении 1:1 с разбавителем С с последующим смешиванием с красителем РКН67, разбавленным в разбавителе С (конечное соотношение краситель:образец составляло 1:500 об./об.), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. со встряхиванием при 100 об./мин. Свободный краситель удаляли очисткой LPMP на обессоливающих микроцентрифужных колонках Zeba™ (40 кДа MWCO, Thermo Fisher Scientific), уравновешенных PBS. Меченые LPMP стерилизовали с использованием стерильных фильтров с размером пор 0,2 мкм, концентрировали ультрацентрифугированием (30 мин., 100000 g, 4°C) и ресуспендировали в стерильном PBS. Конечную концентрацию и средний размер LPMP ($1,1 \times 10^{12}$ LPMP/мл и 83 ± 19 нм для LPMP; $8,95 \times 10^{11}$ и 100 ± 30 нм для DOTAP) определяли посредством NanoFCM. Интенсивность флуоресценции определяли с использованием спектрофотометра (SpectraMax®) при Ex/Em=485/510 нм. Свободный краситель РКН67 в той же концентрации (1:500 об./об.) очищали с использованием того же подхода.

Клетки COLO679 культивировали в среде RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) с 10% термоинактивированной FBS (Gibco) и 1% пенициллином-стрептомицином (Gibco). Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 6000 клеток/луночка за день до эксперимента. Чтобы определить поглощение РКН67-меченных LPMP, клетки COLO679 инкубировали с LPMP при концентрации 2×10^{10} частиц на луночку в течение 3 ч. при 37 °C. Свободный краситель РКН67 использовали в качестве контроля. По окончании времени инкубации клетки промывали два раза ледяным 1x PBS и фиксировали с помощью 100 мкл 4% формальдегида в PBS в течение 15-30 мин. Ядра клеток окрашивали с использованием DAPI (Thermo Fisher Scientific). Изображения получали с использованием флуоресцентного микроскопа (Olympus IX83) с объективом 40x. Модификация посредством DOTAP увеличивала поглощение/ассоциацию LPMP с клетками COLO679 по сравнению с LPMP без катионных липидов (фиг. 5). Наши данные свидетельствуют о том, что у LPMP, модифицированных посредством DOTAP, увеличивалось поглощение и/или ассоциация носителя с клетками COLO679 по сравнению с LPMP без дополнительных катионных липидов.

е) Повышенная доставка РНК в клетки растений модифицированными посредством DC-холестерина РМР

Клетки Zea mays Black Mexican sweet (BMS) приобретали в Центре биологических ресурсов Arabidopsis (ABRC). Клетки BMS выращивали в основной среде Мурасиге-Скуга pH 5,8, содержащей 4,3 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma M5524), 2% сахарозы (S0389, Millipore Sigma), 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (D7299, Millipore Sigma), 250 мкг/л тиамин-НCL (V-014, Millipore Sigma) и 1x раствор витаминов MS в ddH₂O. 1x раствор витаминов содержал ниацин (N0761-100G, Millipore Sigma),

пироксидина гидрохлорид (P6280-25G, Millipore Sigma), гемикальциевую соль D-пантотеновой кислоты (P5155-100G, Millipore Sigma), L-аспарагин (A4159-25G, Millipore Sigma) и миоинозитол (I7508-100G, Millipore Sigma) в соответствующих конечных концентрациях 1,3 мг/л, 250 мкг/л, 250 мкг/л, 130 мг/л и 200 мг/л. Клетки выращивали в вентилируемых конических стерильных колбах объемом 1 л в темноте при 24°C при перемешивании (110 об./мин.).

Для обработок клеток BMS отбирали по 10 мл клеточных суспензий для определения общего объема клеток в процентах (PCV). PCV определяли как объем клеток, деленный на общий объем аликвоты культуры клеток и выраженный в процентах. Клетки центрифугировали в течение 5 мин. при 3900 об./мин. и определяли объем клеточного осадка. % PCV для BMS составил 20%. В случае эксперимента по поглощению % PCV культур доводили до 4% путем разбавления клеток в среде, как это описано выше. LPMP и LPMP, модифицированные DC-холестерином, загружали *tracrRNA*, меченной АТТО 550, как это описано выше, стерилизовали и ресуспендировали в стерильной воде. Средний размер и концентрацию частиц проанализировали посредством NanoFCM и они составили 104 ± 25 нм и $2,54 \times 10^{11}$ LPMP/мл для DC-холест. и 89 ± 15 нм и $1,54 \times 10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP. Количество *tracrRNA* АТТО 550 (IDT) в образцах определяли посредством Quant-iT™ RiboGreen®. 50 мкл как LPMP, так и LPMP, модифицированных DC-холестерином, содержащих 433 нг *tracrRNA*, добавляли к аликвоте суспензии растительных клеток объемом 450 мкл в 24-луночной планшете в двух экземплярах. К клеткам добавляли 50 мкл сверхчистой стерильной воды, которую использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали в течение 3 часов при 24°C в темноте и трижды промывали с использованием 1 мл сверхчистой стерильной воды для удаления частиц, которые не были захвачены клетками. Клетки ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой стерильной воды для визуализации на эпифлуоресцентном микроскопе (Olympus IX83). По сравнению с отрицательным контролем (сверхчистая стерильная вода), у которого отсутствовала обнаруживаемая флуоресценция, в растительных клетках, обработанных LPMP и LPMP, модифицированными DC-холестерином, можно было обнаружить варьирующий флуоресцентный сигнал (фиг. 6). LPMP, модифицированные DC-холестерином, показали наиболее сильный сигнал флуоресценции, указывая на то, что эта модификация РМР обеспечивает наиболее высокую доставку *tracrRNA* в растительные клетки. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что модификация LPMP посредством катионного липида DC-холестерина улучшала поглощение LPMP лимона растительными клетками *in vitro*.

Пример 14. Модификация РМР с использованием ионизируемых липидов

В этом примере показана способность изменять поверхностный заряд в зависимости от рН, увеличивая емкость загрузки и клеточное поглощение РМР в растительных клетках, путем модификации РМР посредством ионизируемых липидов. В этом примере C12-200 (1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)

(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азанедиил)бис(додекан-2-ол)) и MC3 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат, DLin-MC3-DMA) использовали как модельные ионизируемые липиды, РМР лимона использовали как модельный РМР и транс-активирующую РНК CRISPR (tracrRNA), одиночную направляющую РНК (gRNA) как модельную отрицательно заряженную полезную нагрузку. Клетки маиса Black Mexican Sweet (BMS) использовали как модельную линию клеток растения.

а) Модификация РМР посредством ионизируемых липидов

Для получения модифицированных липидами РМР (LPMP) липиды экстрагировали посредством способа Блая-Дайера (Bligh and Dyer, 1959, J Biolchem Physiol 37:911-917) из концентрированного раствора РМР лимона, выделенных так, как это описано в примере 13. Ионизируемые липиды добавляли к исходному раствору экстрагированных липидов РМР в смеси хлороформ:метанол (9:1) до 25% или 40% (мас./мас.) от общих липидов с последующим энергичным перемешиванием. Высушенную липидную пленку и восстановленные РМР из экстрагированных липидов получали так, как это описано в примере 13. Размер LPMP и количество частиц оценивали посредством NanoFCM. Диапазон размера и концентраций LPMP составлял 83 ± 19 нм и $1,7 \times 10^{12}$ LPMP/мл для LM LPMP, 88 ± 22 нм и $1,35 \times 10^{12}$ LPMP/мл для MC3-модифицированных LPMP и 86 ± 16 нм и $1,19 \times 10^{12}$ LPMP/мл для C12-200-модифицированных РМР (фиг. 7). Поверхностный заряд (дзета-потенциал) измеряли посредством динамического рассеяния света с использованием Zetasizer (Malvern Panalytical). Модификация РМР с восстановленными липидами посредством ионизируемых липидов C12-200 и MC3 обеспечила возможность рН-зависимого изменения поверхностного заряда LPMP: с уменьшением рН поверхностный заряд LPMP увеличивался (фиг. 8А).

б) Загрузка модифицированных ионизируемым липидом РМР отрицательно заряженным грузом

TracrRNA/gRNA, растворенную в воде, свободной от нуклеаз, или в двухфазном буфере (IDT®), добавляли к высушенной липидной пленке при концентрации 1,5 нмоль на 1 мг липидов РМР и оставляли на 1 ч. при комнатной температуре для гидратации. 0,1 М цитратный буфер рН 3,2 (Teknova) использовали для доведения рН раствора ресуспендированных липидов до 4,5, чтобы способствовать захвату РНК. Затем раствор липидов подвергали 5 циклам замораживания-оттаивания. Впоследствии рН раствора липидов доводили до рН 9 с использованием 0,1 М бикарбонатного буфера (рН 10), а затем липиды подвергали дополнительным 5 циклам замораживания-оттаивания. Образованные липидные частицы экстрагировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids). Загруженные РМР подвергали диализу в течение ночи против PBS в устройстве для диализа (Spectrum®) с мембраной MWCO 100 кДа, а затем стерилизовали с использованием фильтров из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,2 мкм. Дополнительно образцы очищали и концентрировали с использованием

ультрацентрифугирования. Загруженные РМР центрифугировали в течение 30 мин. при 100000 x g при 4 °С, супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 1 мл PBS и концентрировали при 100000 x g в течение 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в воде (для клеточного поглощения клетками растений). Размер РНК-нагруженных LPMP и количество частиц оценивали посредством NanoFCM. Средний размер и концентрация частиц составляли 89 ± 15 нм и $1,54 \times 10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP; 87 ± 16 нм и $7,15 \times 10^{11}$ LPMP/мл для C12-200-модифицированных LPMP и 93 ± 27 нм и $2,4 \times 10^{11}$ LPMP/мл для MC3-модифицированных LPMP. Загрузку РНК определяли посредством анализа RiboGreen™ или путем измерения интенсивности флуоресценции меченого груза (tracrRNA ATTO 550). Анализ RiboGreen™ выполняли согласно протоколу производителя в присутствии гепарина (5 мг/мл) и 1% Triton-X100 для лизиса РМР и высвобождения инкапсулированного груза. Модификация РМР с восстановленными липидами посредством ионизируемых липидов MC3 и C12-200 обеспечила возможность рН-зависимого изменения поверхностного заряда LPMP и увеличила загрузку отрицательно заряженного груза (например, РНК) при кислом показателе рН по сравнению с LPMP без ионизируемых липидов (фиг. 8В и 8С).

с) Повышенное поглощение РМР, модифицированных посредством C12-200, клетками растения (BMS)

Клетки Black Mexican Sweet (BMS) *Zea mays* культивировали так, как это описано в примере 13(е). Для обработки клеток BMS отбирали по 10 мл клеточных суспензий для определения общего объема клеток в процентах (PCV). PCV определяли как объем клеток, деленный на общий объем аликвоты культуры клеток и выраженный в процентах. Клетки центрифугировали в течение 5 мин. при 3900 об./мин. и определяли объем клеточного осадка. % PCV для BMS составил 20%. В случае эксперимента по поглощению % PCV культур доводили до 4% путем разбавления клеток в среде, как это описано выше. LPMP и LPMP, модифицированные посредством C12-200, загружали tracrRNA ATTO 550, как это описано выше, стерилизовали и ресуспендировали в стерильной воде. Средний размер и концентрацию частиц проанализировали посредством NanoFCM, и они составили 87 ± 16 нм и $7,15 \times 10^{11}$ LPMP/мл для C12-200-LPMP и 89 ± 15 нм и $7,15 \times 10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP. Количество tracrRNA ATTO 550 (IDT) в образцах определяли посредством Quant-iT™ RiboGreen™. 50 мкл как LPMP, так и LPMP, модифицированных посредством C12-200, содержащих 433 нг tracrRNA, добавляли к аликвоте суспензии растительных клеток объемом 450 мкл в 24-луночном планшете в двух экземплярах. К клеткам добавляли 50 мкл сверхчистой стерильной воды, которую использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали в течение 3 часов при 24°C в темноте и трижды промывали с использованием 1 мл сверхчистой стерильной воды для удаления частиц, которые не были захвачены клетками. Клетки ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой стерильной воды для визуализации на эпифлуоресцентном микроскопе (Olympus IX83). По сравнению с отрицательным контролем (сверхчистая стерильная вода), у которого отсутствовала выявляемая

флуоресценция, в растительных клетках, обработанных LPMP и LPMP, модифицированными посредством C12-200, можно было обнаружить варьирующий флуоресцентный сигнал (фиг. 9). LPMP, модифицированные посредством C12-200, показали наиболее сильный сигнал флуоресценции, указывая на то, что эта модификация РМР обеспечивает наиболее высокую доставку/ассоциацию tracrRNA с растительными клетками. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что модификация LPMP посредством ионизируемого липида C12-200 улучшала поглощение LPMP лимона растительными клетками *in vitro*.

Пример 15. Модификация РМР белком целлюлазой, обеспечивающим проникновение сквозь клеточную стенку

В этом примере демонстрируется возможность повышения клеточного поглощения РМР клетками растений, грибов или бактерий путем модификации РМР целлюлазой для облегчения разрушения компонентов клеточной стенки. В этом примере целлюлазу использовали как модельный фермент, разрушающий клеточную стенку, РМР грейпфрута использовали как модельный РМР, а клетки маиса Black Mexican Sweet использовали как модельную клетку растения.

Протокол эксперимента

а) Синтез целлюлазо-PEG4-азида

Для отслеживания фермента целлюлазу (Sigma Aldrich) метили флуоресцентной меткой Alexa Fluor® 488 (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, то 20 мг целлюлазы растворяли в 2 мл бикарбонатного буфера (pH 8,3) до конечной концентрации 10 мг/мл. Alexa Fluor® 488 (AF488) растворяли в безводном DMSO (10 мг/мл) и добавляли 30 мкл AF488 к растворенной целлюлазе. После инкубации в течение 1 ч. при комнатной температуре (RT), 150 об./мин, в темноте смесь оставляли на ночь при 4°C. Свободный краситель удаляли посредством обессоливающих колонок PD-10, уравновешенных PBS (GE Healthcare). Собранную AF488-меченную целлюлазу в PBS (0,45 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА) подвергали взаимодействию с NHS-PEG4-азидом (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, то NHS-PEG4-азид растворяли в безводном DMSO до конечной концентрации 100 мМ и добавляли к 2 мл AF488-меченной целлюлазы до конечной концентрации 10 мМ. Два раствора смешивали и инкубировали при комнатной температуре, 150 об./мин., 30 мин. в темноте. Реакцию останавливали добавлением трис-НСl до конечной концентрации 100 мМ. Пробирку оставляли на 2 ч. при 4°C для полной остановки реакции, а затем проводили очистку с использованием обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS. Устройство Amicon® Ultra 10K (MWCO 10 кДа, 4 мл) использовали для концентрирования AF488-меченного целлюлазо-PEG4-азида. Модифицированная целлюлаза имела концентрацию белка 0,38 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА, и сохраняла исходную ферментативную активность на уровне 32%, определенную посредством набора для флуориметрического анализа целлюлазой

активности (Absam).

б) Модификация РМР целлюлазо-PEG4-азидом

Использовали несколько стратегий для модификации поверхности РМР грейпфрута посредством целлюлазы.

Протокол модификации б.1

Проводили реакцию аминогрупп РМР с NHS-фосфином (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя, а затем РМР-фосфин конъюгировали с AF488-меченым целлюлазо-PEG4-азидом (как описано в примере 15(a)) в реакции, не содержащей соединений меди, между фосфиновыми и азидными группами. Если вкратце, то NHS-фосфин растворяли в безводном DMSO до конечной концентрации 10 мМ и добавляли к РМР, ресуспендированном в PBS ($8,4 \times 10^{12}$ РМР/мл) до конечной концентрации NHS-фосфина 1 мМ. Два раствора смешивали и инкубировали при комнатной температуре, 150 об./мин, в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением трис-HCl до конечной концентрации 150 мМ. Пробирку оставляли на 2 ч. при 4°C для полной остановки реакции, а затем проводили очистку с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа, 0,5 мл) и обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS. Затем РМР-фосфин смешивали с 700 мкл AF488-меченого целлюлазо-PEG4-азида и инкубировали в течение 3 ч. при 37°C в темноте. Смесь подвергали диализу против PBS в течение 2 дней при 4°C с использованием диализной пробирки Spectra/Por® Biotech-Grade MWCO 300 кДа (Spectrum Laboratories Inc.) для удаления несвязанной целлюлазы и дополнительных химических веществ и побочных продуктов. После диализа целлюлаза-модифицированные РМР концентрировали с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа). Конечный продукт имел концентрацию белка 0,8 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА, и концентрацию частиц $5,3 \times 10^{12}$ РМР/мл с гейтированной по сигналу флуоресценции популяцией, составляющей 4%, определенной посредством NanoFCM. Остаточная от исходной активность фермента составила 9,3%.

Протокол модификации б.2

Проводили реакцию карбоксильных групп РМР с NH₂-DBCO (MilliporeSigma) в соответствии с инструкциями производителя, а затем РМР-DBCO конъюгировали с AF488-меченым целлюлазо-PEG4-азидом (пример 15(a)) в химической реакции, не содержащей соединений меди, между DBCO и азидными группами. Сначала карбоксильные группы РМР активировали с использованием гидрохлорида EDC (гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, то 0,2 мл РМР грейпфрута ($3,8 \times 10^{13}$ РМР/мл) смешивали с 1 мг EDC, свежерастворенного в ацетатном буфере (конечный pH ~5-5,5). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин., а затем объединяли с растворенным DBCO-NH₂ (10 мМ, безводный DMSO) до конечной концентрации 1 мМ. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре, 150 об./мин., 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 М трис-HCl до конечной

концентрации 150 мМ. Пробирку оставляли на 2 ч. при 4°C для полной остановки реакции, а затем проводили очистку с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа, 0,5 мл) и обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS. Затем PMP-DBCO смешивали с 700 мкл AF488-меченного целлюлазо-PEG4-азида и инкубировали в течение 3 ч. при 37°C в темноте. Для удаления несвязанной целлюлазы и побочных продуктов смесь подвергали диализу против PBS в течение 2 дней при 4°C с использованием диализной пробирки Spectra/Por® Biotech-Grade MWCO 300 кДа (Spectrum Laboratories Inc.). После диализа целлюлаза-модифицированные PMP концентрировали с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа). Конечный продукт имел концентрацию белка 0,9 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА, и концентрацию частиц $5,2 \times 10^{12}$ PMP/мл с гейтированной по сигналу флуоресценции популяцией, составляющей 7%, определенной посредством NanoFCM. Остаточная от исходной активность фермента составила 8,4%, что определено посредством набора для флуориметрического анализа целлюлазной активности (Abscam).

Протокол модификации b.3

Проводили реакцию аминокрупп PMP с NHS-PEG4-DBCO (MilliporeSigma) в соответствии с инструкциями производителя, а затем PMP-PEG4-DBCO конъюгировали с AF488-меченым целлюлазо-PEG4-азидом (пример 15(a)) в реакции, не содержащей соединений меди, между DBCO и азидными группами. Если вкратце, то NHS-PEG4-DBCO растворяли в безводном DMSO до конечной концентрации 10 мМ и добавляли к PMP, ресуспендированному в PBS ($8,4 \times 10^{12}$ PMP/мл) до конечной концентрации NHS-PEG4-DBCO 1 мМ. Два раствора смешивали и инкубировали при комнатной температуре, 150 об./мин., 30 мин. Реакцию останавливали добавлением трис-НСI до конечной концентрации 150 мМ. Пробирку оставляли на 2 ч. при 4°C для полной остановки реакции, а затем проводили очистку с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа, 0,5 мл) и обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS. Затем PMP-PEG4-DBCO смешивали с 700 мкл AF488-меченного целлюлазо-PEG4-азида и инкубировали в течение 3 ч. при 37°C в темноте. Смесь подвергали диализу против PBS в течение 2 дней при 4°C с использованием диализной пробирки Spectra/Por® Biotech-Grade MWCO 300 кДа (Spectrum Laboratories Inc.). После диализа целлюлаза-модифицированные PMP концентрировали с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа). Конечный продукт имел концентрацию белка 1,3 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА, и концентрацию частиц 2×10^{12} PMP/мл с гейтированной по сигналу флуоресценции популяцией, составляющей 17%, определенной посредством NanoFCM. Остаточная от исходной активность фермента составила 17%, что определено посредством набора для флуориметрического анализа целлюлазной активности (Abscam).

с) Модификация PMP посредством целлюлазы (с.1)

Проводили реакцию карбоксильных групп PMP грейпфрута с аминокгруппами

AF488-меченной целлюлазы с использованием карбодиимидной химии. Сначала карбоксильные группы РМР активировали с использованием гидрохлорида EDC (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, то 0,2 мл РМР грейпфрута ($3,8 \times 10^{13}$ РМР/мл) смешивали с 1 мг EDC, свежерастворенного в ацетатном буфере (конечный pH $\sim 5-5,5$) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем AF488-меченную целлюлазу инкубировали с активированными РМР в течение 2 ч. при комнатной температуре, 150 об./мин., в темноте. Очистку проводили посредством обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS, с последующим диализом против PBS в течение 2 дней при 4°C с использованием диализной пробирки Spectra/Por® Biotech-Grade MWCO 300 кДа (Spectrum Laboratories Inc.). После диализа целлюлаза-модифицированные РМР концентрировали с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа). Конечный продукт имел концентрацию белка 1,1 мг/мл, что определено посредством анализа ВСА, и концентрацию частиц $1,6 \times 10^{12}$ РМР/мл с гейтированной по сигналу флуоресценции популяцией, составляющей 27%, определенной посредством NanoFCM. Остаточная от исходной активность фермента составила 9,2%, что определено посредством набора для флуориметрического анализа целлюлазной активности (Absam).

d) Маркировка целлюлаза-модифицированных РМР липофильным красителем

Полученные в результате AlexaFluor488-меченные целлюлаза-модифицированные РМР грейпфрута метили липофильным красителем RKN26 (MilliporeSigma), чтобы получить двойное мечение (зеленый - AF488 и красный - RKN26). Модифицированные РМР (2×10^{12} РМР/мл в PBS) смешивали с разбавителем С (MilliporeSigma) при соотношении 1:1 об./об. Краситель RKN26 растворяли в разбавителе С и смешивали с предварительно разбавленными РМР при конечном соотношении, равном 1:500 (краситель: разбавитель С, об./об.). Реакционные смеси инкубировали в течение 30 минут при 37°C с последующей очисткой с использованием обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba (MWCO 7 кДа), уравновешенных PBS, для свободного свободного красителя. Затем RKN26-меченные целлюлаза-модифицированные РМР концентрировали с использованием устройства Amicon® Ultra 100K (MWCO 100 кДа, 10 мин., 4000g, 3 раза). Конечные РМР анализировали с использованием NanoFCM (приблизительно 7×10^{12} РМР/мл) и нормализовали по интенсивности флуоресценции метки RKN26 (Ex/Em=550/570 нм). Свободный краситель, инкубированный с разбавителем С и очищенный таким же образом, как описано выше, использовали в качестве контроля.

e) Повышенное РМР-поглощение клетками BMS растения Zea mays целлюлаза-модифицированных РМР грейпфрута

Клетки Black Mexican sweet (BMS) Zea mays выращивали так, как это описано в примере 13(e). Для обработок клеток BMS отбирали по 10 мл клеточных суспензий для определения общего объема клеток в процентах (PCV). Клетки центрифугировали в течение 5 мин. при 3900 об./мин. и определяли объем клеточного осадка. % PCV для BMS

составил 20%. В случае эксперимента по поглощению % PCV культур довели до 4% путем разбавления клеток в среде, как описано выше.

PMP грейпфрута конъюгировали с AlexaFluor488-меченной целлюлазой с использованием различных поперечных связей, получая конъюгированные с целлюлазой PMP, как это описано в примере 15(b), с последующим мечением посредством PKN26 липидной мембраны PMP. Также была приготовлена контрольная группа PMP грейпфрута, меченных PKN26, но без модификации целлюлазой (GF-PMP). Все образцы стерилизовали, ресуспендировали в стерильной воде и анализировали посредством NanoFCM, анализа белка и анализа целлюлазной активности, как это описано выше. Затем по 250 мкл каждого из целлюлаза-модифицированных PMP и GF-PMP, содержащих равное количество PMP ($2,65 \times 10^{12}$ PMP/мл), добавляли к 250 мкл суспензии клеток BMS в 24-луночной планшете в двух экземплярах. К клеткам добавляли 250 мкл сверхчистой стерильной воды и контроль маркировки со свободным красителем PKN26, которые использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали в течение 30 минут при 24°C в темноте и трижды промывали с использованием 1 мл сверхчистой стерильной воды для удаления частиц, которые не были захвачены клетками. Клетки ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой стерильной воды для визуализации на эпифлуоресцентном микроскопе (Olympus IX83). В клетках, инкубированных со сверхчистой стерильной водой и контролем для маркировки PKN26, отсутствовал выявляемый уровень флуоресценции. Флуоресцентный сигнал от клеток, инкубированных с GF-PMP, меченных PKN26, был очень низким/не определяемым по сравнению с флуоресцентным сигналом от растительных клеток, обработанных PMP, модифицированными целлюлазой (фиг.10). PMP, модифицированные целлюлазо-азидом посредством линкеров NH₂-DBCO (протокол модификации b.2) или NHS-PEG4-DBCO (протокол модификации b.3), показали наиболее сильный сигнал флуоресценции, указывая на то, что эти целлюлаза-модифицированные PMP характеризовались наибольшим поглощением растительными клетками. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что модификация PMP целлюлазой улучшает поглощение PMP грейпфрута клетками растений *in vitro*.

Другие варианты осуществления

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения находятся в следующих пронумерованных абзацах.

1. Композиция на основе пакета-мессенджера растений (PMP), содержащая совокупность модифицированных PMP, характеризующихся повышенным поглощением клетками по сравнению с немодифицированным PMP.

2. Композиция на основе PMP по пункту 1, где повышенное поглощение клетками представляет собой поглощение клетками, которое на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% превышает такое поглощение у немодифицированного PMP.

3. Композиция на основе PMP по пункту 1, где повышенное поглощение клетками

представляет собой поглощение клетками, которое в по меньшей мере 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз или 1000 раз превышает такое поглощение у немодифицированного РМР.

4. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-3, где клетка является растительной клеткой.

5. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-3, где клетка является бактериальной клеткой.

6. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-3, где клетка является клеткой гриба.

7. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-6, где модифицированные РМР содержат средство, способствующее проникновению в клетку.

8. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-7, где модифицированные РМР содержат средство, способствующее проникновению в клетку.

9. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-7, где модифицированные РМР содержат средство, способствующее проникновению в бактериальную клетку.

10. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-7, где модифицированные РМР содержат средство, способствующее проникновению в клетку гриба.

11. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-10, где средство, способствующее проникновению в клетку, содержит фермент или его функциональный домен.

12. Композиция на основе РМР по пункту 11, где фермент представляет собой бактериальный фермент, фермент гриба, растительный фермент или фермент простейшего.

13. Композиция на основе РМР по пункту 12, где фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериального фермента, способного расщеплять клеточные стенки, или ее частью.

14. Композиция на основе РМР по пункту 12, где фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента гриба, способного расщеплять клеточные стенки, или ее частью.

15. Композиция на основе РМР по пункту 12, где фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью растительного фермента, способного расщеплять клеточные стенки, или ее частью.

16. Композиция на основе РМР по пункту 12, где фермент характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью фермента простейших, способного расщеплять клеточные стенки, или ее частью.

17. Композиция на основе РМР по пункту 12, где фермент представляет собой целлюлазу.

18. Композиция на основе РМР по пункту 17, где целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью бактериальной целлюлазы или ее частью.

19. Композиция на основе РМР по пункту 17, где целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы гриба или ее частью.

20. Композиция на основе РМР по пункту 17, где целлюлаза характеризуется по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, или 100% идентичностью со всей последовательностью целлюлазы простейшего или ее частью.

21. Композиция на основе РМР по пункту 8, где средство, способствующее проникновению в клетку, предусматривает детергент.

22. Композиция на основе РМР по пункту 21, где детергент представляет собой сапонин.

23. Композиция на основе РМР по пункту 8, где средство, способствующее проникновению в клетку, предусматривает катионный липид.

24. Композиция на основе РМР по пункту 23, где катионный липид представляет собой 1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC).

25. Композиция на основе РМР по пункту 23, где катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC).

26. Композиция на основе РМР 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 на основе РМР по пункту 26, где РМР являются стабильными в течение по меньшей мере 24 часов, 48 часов, семи дней или 30 дней.

28. Композиция на основе РМР по пункту 27, где РМР являются стабильными при температуре, составляющей по меньшей мере 4°C, 20°C, 24°C или 37°C.

29. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-28, где РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для снижения приспособленности гриба.

30. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-28, где РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для снижения приспособленности бактерии.

31. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-28, где РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

32. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-28, где РМР в композиции присутствуют в концентрации, эффективной для снижения приспособленности растения.

33. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-32, где совокупность модифицированных РМР в композиции присутствует в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка РМР/мл.

34. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-33, где модифицированные РМР содержат гетерологичное функциональное средство.

35. Композиция на основе РМР по пункту 34, где модифицированные РМР содержат два или более различных гетерологических функциональных средств.

36. Композиция на основе РМР по пункту 34 или 35, где гетерологическое функциональное средство инкапсулировано каждым РМР из совокупности РМР.

37. Композиция на основе РМР по пункту 34 или 35, где гетерологическое функциональное средство встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР.

38. Композиция на основе РМР по пункту 34 или 35, где гетерологическое функциональное средство конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР.

39. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 34-38, где гетерологическое функциональное средство представляет собой удобряющее средство.

40. Композиция на основе РМР по пункту 39, где удобряющее средство представляет собой питательное вещество для растений.

41. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 34-38, где гетерологическое функциональное средство представляет собой гербицидное средство.

42. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 34-39 и 41, где гетерологическое функциональное средство представляет собой гетерологический полипептид, гетерологическую нуклеиновую кислоту или гетерологическую малую молекулу.

43. Композиция на основе РМР по пункту 42, где гетерологической нуклеиновой кислотой является ДНК, РНК, РНА или гибридная молекула ДНК-РНК.

44. Композиция на основе РМР по пункту 43, где РНК представляет собой информационную РНК (mRNA), направляющую РНК (gRNA) или ингибирующую РНК.

45. Композиция на основе РМР по пункту 44, где ингибирующая РНК представляет собой RNAi, shRNA или miRNA.

46. Композиция на основе РМР по пункту 44 или 45, где ингибирующая РНК подавляет экспрессию генов в растении.

47. Композиция на основе РМР по пункту 44 или 45, где ингибирующая РНК подавляет экспрессию генов в симбионте растения.

48. Композиция на основе РМР по пункту 42 или 43, где нуклеиновая кислота представляет собой mRNA, модифицированную mRNA или молекулу ДНК, которая повышает в растении экспрессию фермента, порообразующего белка, сигнального лиганда, пептида, проникающего в клетку, фактора транскрипции, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов, рибопротеина, белкового аптамера или шаперона.

49. Композиция на основе РМР по пункту 42 или 43, где нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую

РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолино, LNA, piRNA, рибозим, DNazyme, аптамер, circRNA, gRNA или молекулу ДНК, которая снижает в растении экспрессию фермента, фактора транскрипции, секреторного белка, структурного фактора, рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или

транспортера.

50. Композиция на основе РМР по пункту 42, где полипептид представляет собой фермент, порообразующий белок, сигнальный лиганд, пептид, проникающий в клетку, фактор транскрипции, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов, рибопроtein, белковый аптамер или шаперон.

51. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-50, где растение является сельскохозяйственным или садовым растением.

52. Композиция на основе РМР по пункту 51, где сельскохозяйственное растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы.

53. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-50, где растение является сорняком.

54. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-53, где композиция составлена для доставки по отношению к растению.

55. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-54, где композиция содержит носитель, приемлемый с точки зрения сельского хозяйства.

56. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-55, где композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

57. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии:

(a) 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 характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(c) 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 чистых РМР средством, способствующим проникновению в растительную клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками по сравнению с немодифицированным РМР; и

(e) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к растению.

58. Бактерия, содержащая композицию на основе РМР по любому из пунктов 1-57.

59. Гриб, содержащий композицию на основе РМР по любому из пунктов 1-57.

60. Растение, содержащее композицию на основе РМР по любому из пунктов 1-57.

61. Способ доставки композиции на основе РМР растению, включающий

приведение растения в контакт с композицией на основе РМР по любому из пунктов 1-57.

62. Способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает доставку по отношению к растению эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-57, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

63. Способ по пункту 61 или 62, где РМР содержит гетерологичное удобряющее средство.

64. Способ по любому из пунктов 61-63, где растение является сельскохозяйственным или садовым растением.

65. Способ по пункту 64, где растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы.

66. Способ снижения приспособленности растения, при этом способ включает доставку по отношению к растению эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-57, где способ обеспечивает снижение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

67. Способ по пункту 61 или 66, где РМР содержит гетерологичное пестицидное средство.

68. Способ по любому из пунктов 61, 66 и 67, где растение является сорняком.

69. Способ по любому из пунктов 61-68, где композицию на основе РМР доставляют по отношению к листьям, семенам, корням, плодам, побегам, пыльце или цветку растения.

70. Способ по любому из пунктов 61-69, где композицию на основе РМР доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

71. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-3, где клетка является клеткой млекопитающего.

72. Композиция на основе РМР по любому из пунктов 1-3, где клетка является клеткой человека.

73. Способ повышения приспособленности млекопитающего, при этом способ включает доставку по отношению к млекопитающему эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-57, где способ обеспечивает повышение приспособленности млекопитающего по сравнению с необработанным млекопитающим.

74. Способ по пункту 73, где РМР содержит гетерологичное терапевтическое средство.

75. Способ по пункту 73 или 74, где млекопитающее является человеком.

76. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных, где РМР получены посредством способа, который включает 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 характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(c) 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 чистых РМР средством, способствующим проникновению в клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных по сравнению с немодифицированным РМР; и

(e) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к животному.

77. Способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный ионизируемый липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный ионизируемый липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР.

78. Способ по пункту 77, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% ионизируемого липида.

79. Способ по пункту 77, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV).

80. Способ по пункту 77, где экзогенный ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азанедиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200).

81. Способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный цвиттер-ионный липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный цвиттер-ионный липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР.

82. Способ по пункту 81, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% цвиттер-ионного липида.

83. Способ по пункту 81, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV).

84. Способ по пункту 81, где экзогенный цвиттер-ионный липид представляет собой 1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-

фосфатидилхолин (DOPC).

85. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный катионный липид.

86. Композиция на основе РМР по пункту 85, где каждый РМР из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида.

87. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный ионизируемый липид.

88. Композиция на основе РМР по пункту 87, где каждый РМР из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% ионизируемого липида.

89. Композиция на основе РМР по пункту 87, где ионизируемый липид представляет собой C12-200.

90. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, содержащих экзогенный цвиттер-ионный липид.

91. Композиция на основе РМР по пункту 90, где каждый РМР из модифицированных РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% цвиттер-ионного липида.

92. Композиция на основе РМР по пункту 90, где цвиттер-ионный липид представляет собой DEPC или DOPC.

93. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии:

(a) получения совокупности очищенных РМР;

(b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и

(c) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного катионного липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного катионного липида, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

94. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии:

(a) получения совокупности очищенных РМР;

(b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и

(c) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного ионизируемого липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного ионизируемого липида, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

95. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР

получены посредством способа, который включает стадии:

- (a) получения совокупности очищенных РМР;
- (b) обработки совокупности РМР с получением липидной пленки; и
- (c) восстановления липидной пленки в присутствии экзогенного цвиттер-ионного липида, где восстановленные РМР содержат по меньшей мере 1% экзогенного цвиттер-ионного липида, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками.

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.

Заявляется:

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки пакета-мессенджера растений (РМР) в клетку-мишень, при этом способ включает введение РМР, содержащего экзогенный катионный липид, в клетку-мишень, где РМР, содержащий экзогенный катионный липид, характеризуется повышенным поглощением клеткой-мишенью по сравнению с немодифицированным РМР.

2. Способ по п. 1, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида.

3. Способ по п. 1, где модифицированный РМР содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% липидов, полученных из растительной внеклеточной везикулы (EV).

4. Способ по п. 1, где повышенное поглощение клетками представляет собой поглощение клетками, которое на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% превышает такое поглощение у немодифицированного РМР.

5. Способ по п. 1, где модифицированный РМР содержит гетерологичное функциональное средство.

6. Способ по п. 5, где гетерологичное функциональное средство инкапсулировано каждым РМР из совокупности РМР.

7. Способ по п. 5, где гетерологичное функциональное средство встроено в поверхность каждого РМР из совокупности РМР.

8. Способ по п. 5, где гетерологичное функциональное средство конъюгировано с поверхностью каждого РМР из совокупности РМР.

9. Способ по п. 1, где клетка является растительной клеткой.

10. Способ по п. 1, где клетка является бактериальной клеткой.

11. Способ по п. 1, где клетка является клеткой гриба.

12. Композиция на основе пакета-мессенджера растений (РМР), содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками по сравнению с немодифицированным РМР.

13. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками, где РМР получены посредством способа, который включает стадии:

(a) 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 характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(c) 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 чистых РМР средством, способствующим проникновению в растительную клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением растительными клетками по сравнению с немодифицированным РМР; и

(e) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к растению.

14. Композиция на основе РМР, содержащая совокупность модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных, где РМР получены посредством способа, который включает стадии:

(a) 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 характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

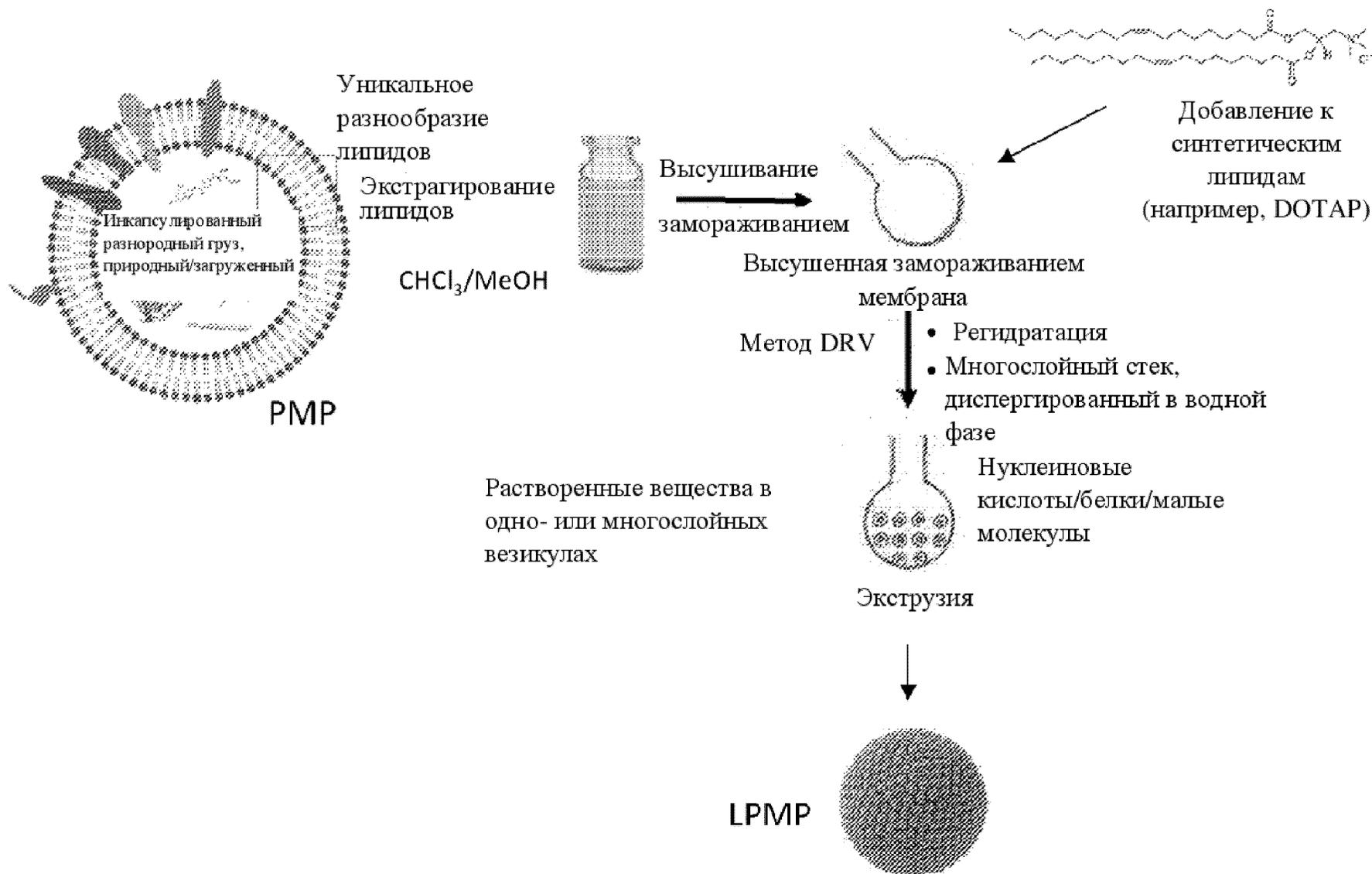
(c) очистки фракции неочищенных РМР с получением совокупности чистых РМР, где совокупность чистых РМР характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV;

(d) загрузки чистых РМР средством, способствующим проникновению в клетку, с получением таким образом модифицированных РМР, характеризующихся повышенным поглощением клетками животных по сравнению с немодифицированным РМР; и

(e) составления РМР из стадии (d) для доставки по отношению к животному.

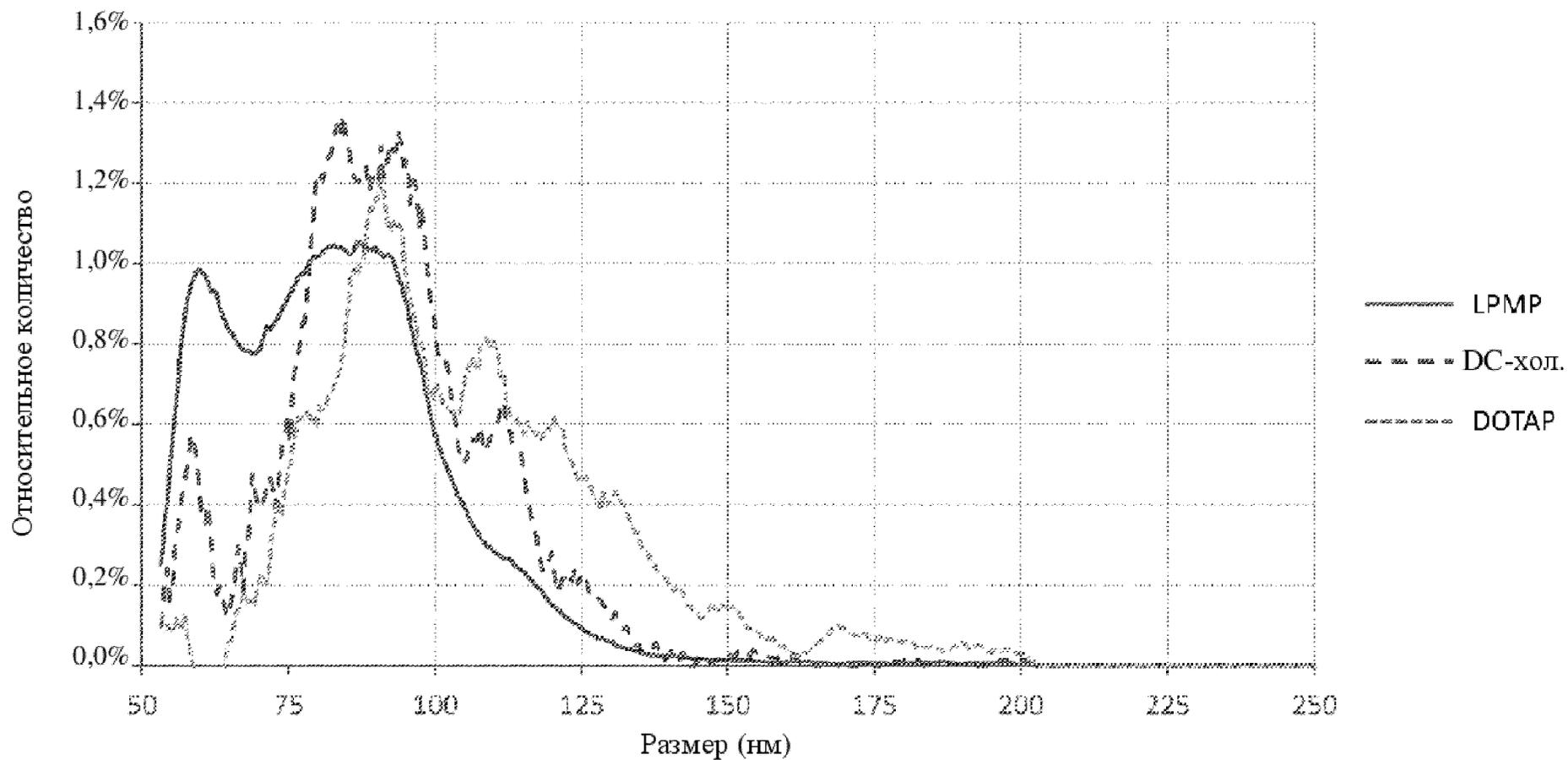
По доверенности

ФИГ. 1

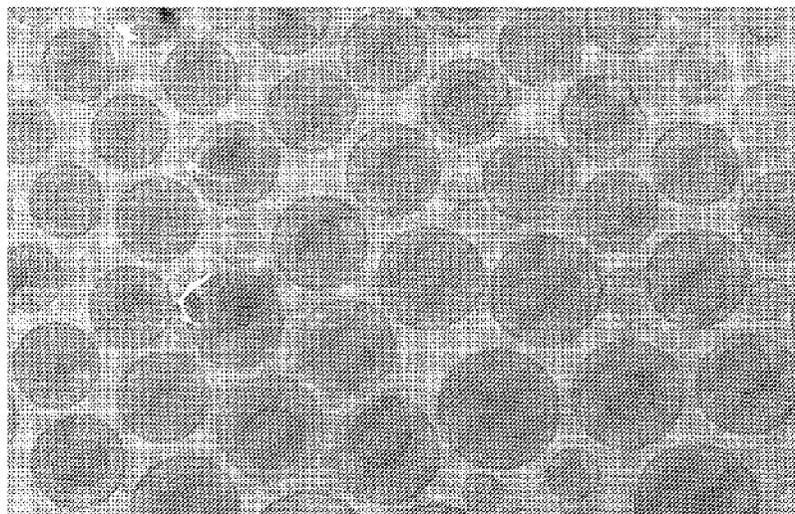


ФИГ. 2

Определение размеров посредством NanoFCM



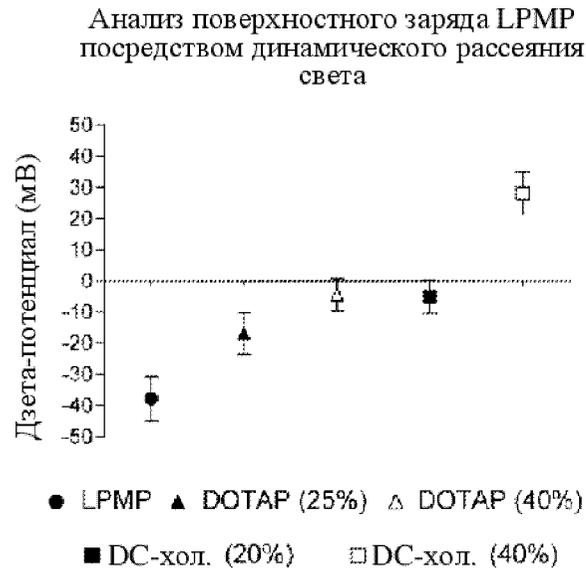
ФИГ. 3А



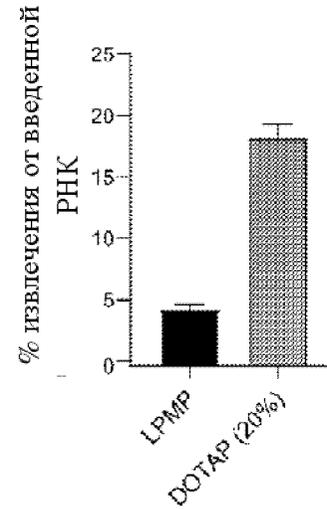
ФИГ. 3В



ФИГ. 4А

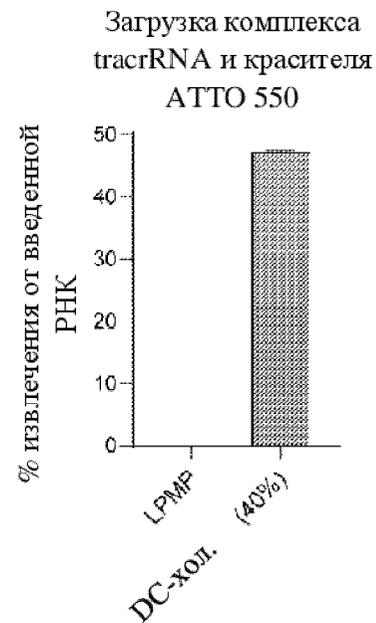


Загрузка комплекса siRNA и красителя Alexa Fluor 550

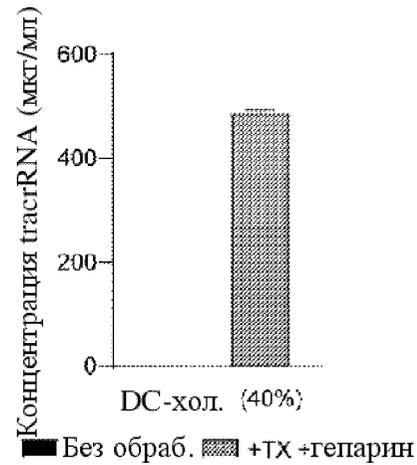


ФИГ. 4В

ФИГ. 4С

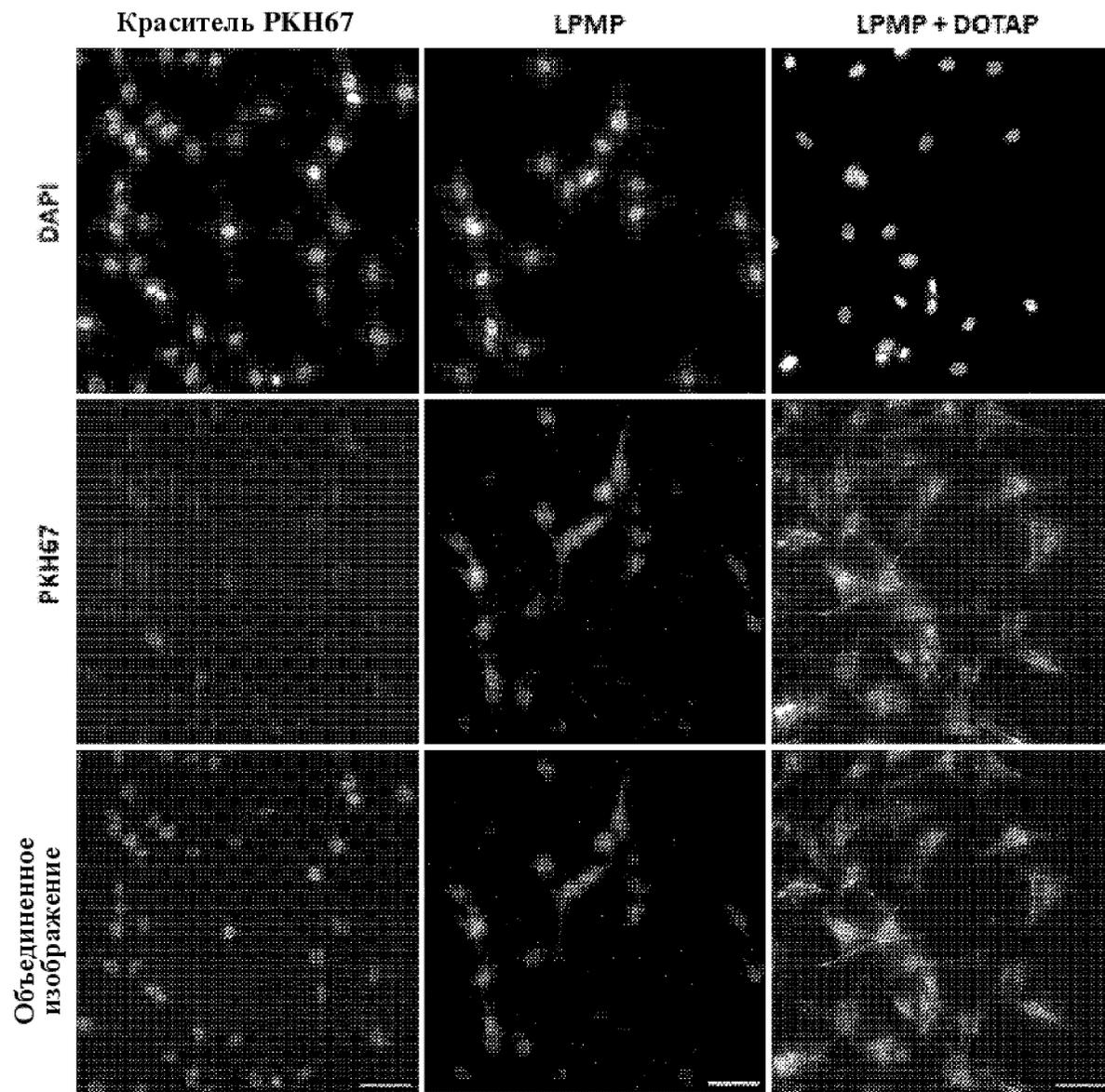


Анализ Quant-iT™ RiboGreen™

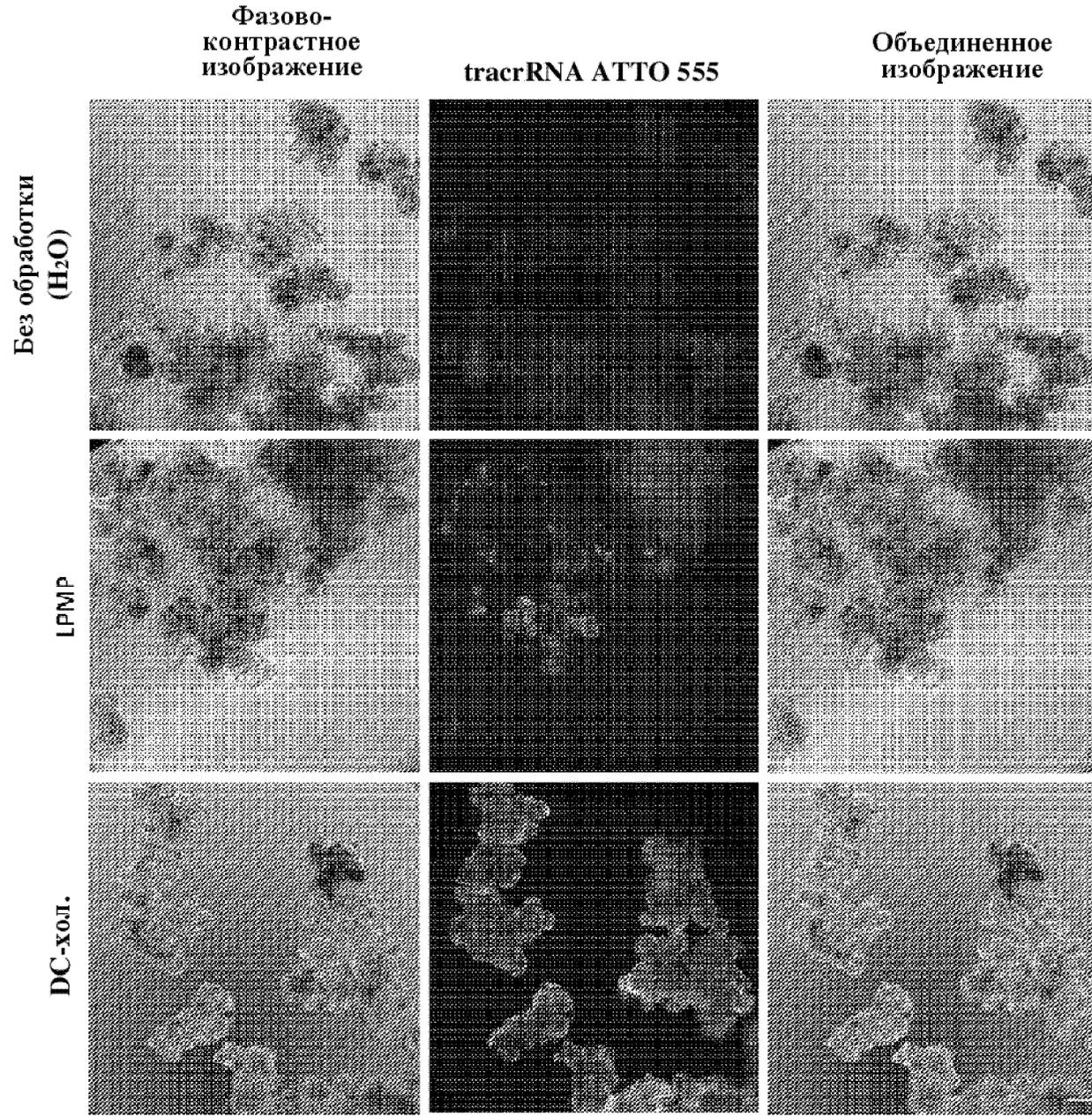


ФИГ. 4D

ФИГ. 5

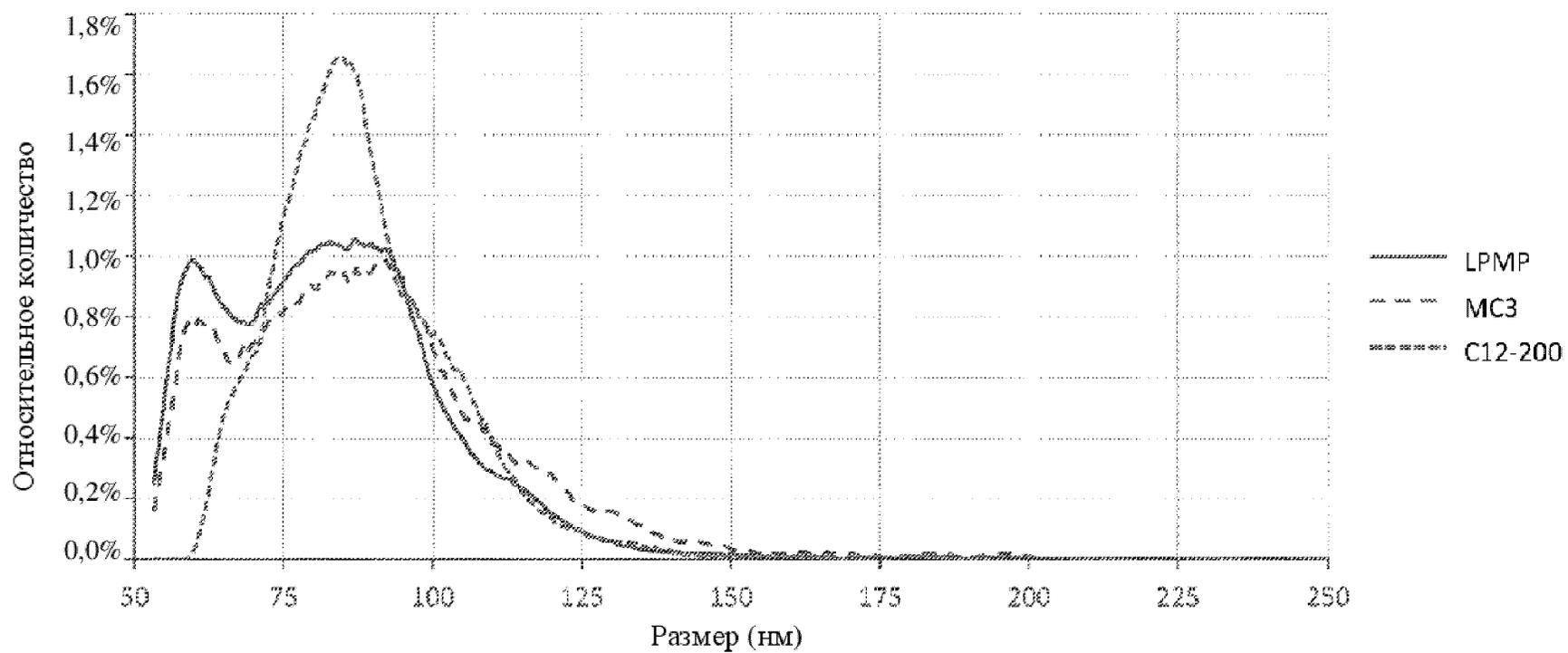


ФИГ. 6



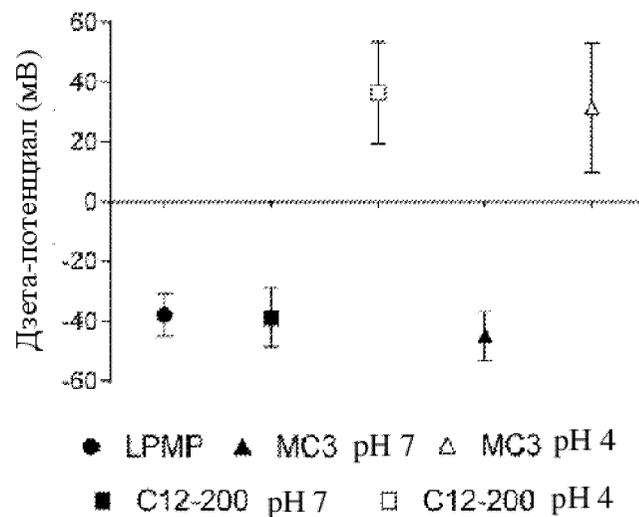
ФИГ. 7

Определение размеров посредством
NanoFCM



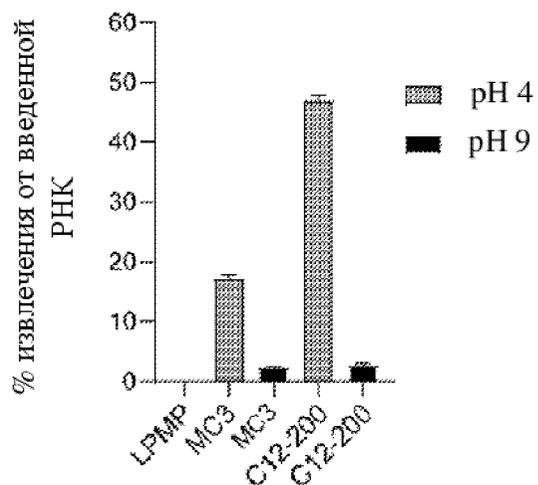
ФИГ. 8А

Анализ поверхностного заряда LPMР
посредством динамического рассеяния света



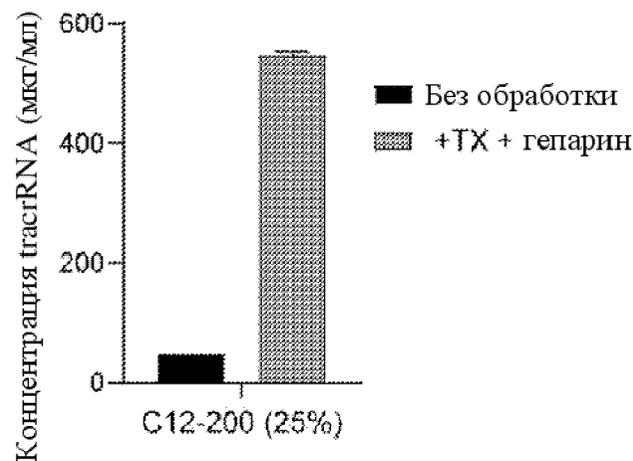
ФИГ. 8В

Загрузка комплекса tracrRNA и
красителя АТТО 550

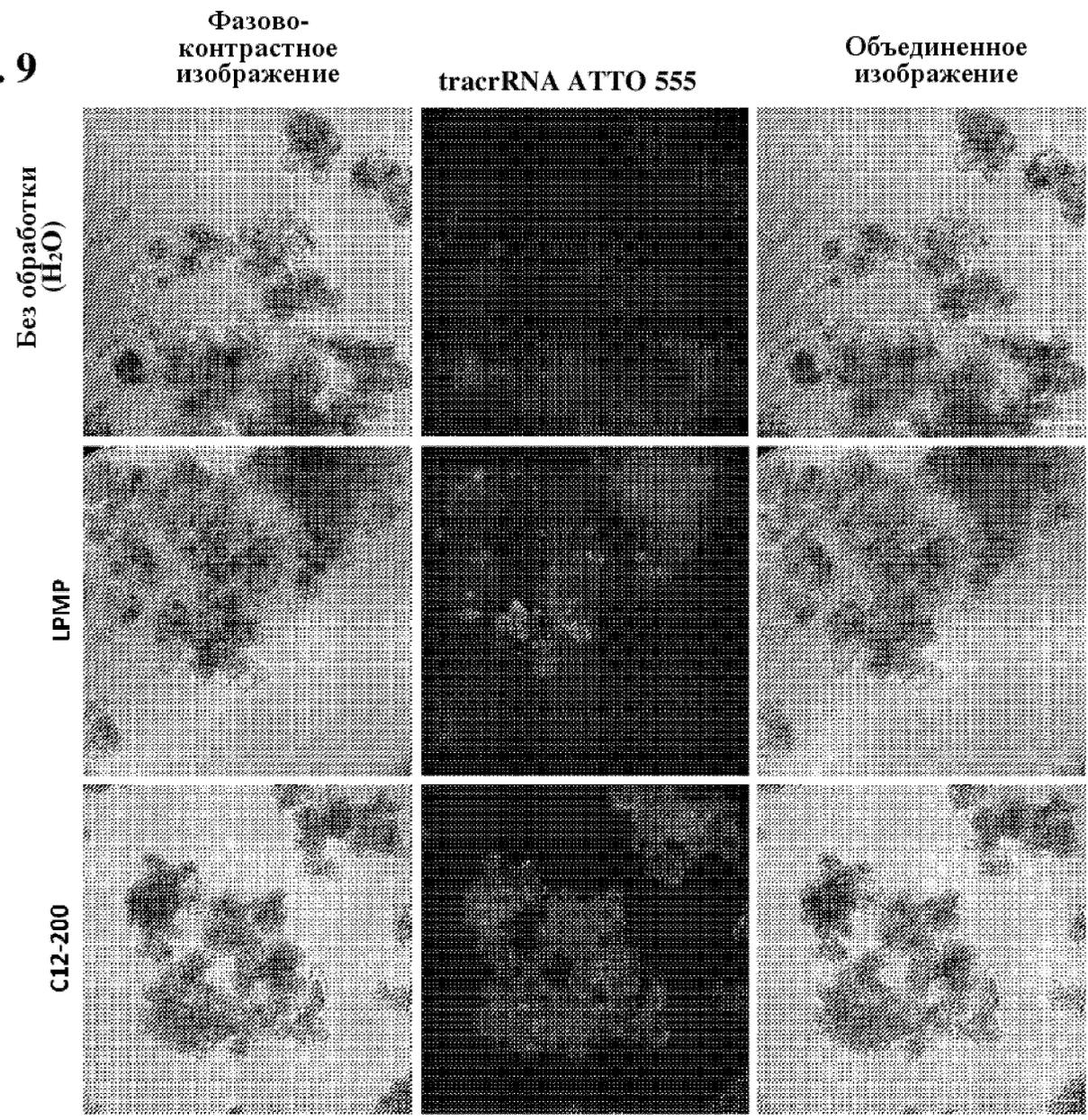


ФИГ. 8С

Анализ Quant-iT™ RiboGreen™



ФИГ. 9



ФИГ. 10

