



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.26**

**(21)** Номер заявки  
**201892762**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.10.15**

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

**(54) НОВЫЕ ХИМЕРНЫЕ ИНСЕКТИЦИДНЫЕ БЕЛКИ, ТОКСИЧНЫЕ ИЛИ ИНГИБИТОРНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ**

**(31)** 62/064,989

**(32)** 2014.10.16

**(33)** US

**(43)** 2019.04.30

**(62)** 201790843; 2015.10.15

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

**(72)** Изобретатель:  
**Баум Джеймс А., Черрути Томас А.,  
Дарт Кристал Л., Инглиш Ли Х.,  
Фу Сяожань, Гузов Виктор М., Хау  
Эрлин Р., Моргенстерн Джей П.,  
Робертс Джеймс К., Сальвадор  
Сара А., Ван Цзиньлин, Фласинский  
Станислав (US)**

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

**(56)** WO-A2-0119859  
DATABASE UniProt [Online] 5 October  
2010 (2010-10-05), "SubName: Full=Cry1Be2  
(ECO:0000313:EMBL:ACV96720.1}";  
XP002753212, retrieved from EBI accession  
no. UNIPROT:D9U3M0, Database accession no.  
D9U3M0, sequence

WO-A1-0214517

DE MAAGD RUUD A. ET AL.:  
"Bacillus thuringiensis delta-endotoxin Cry1C  
domain III can function as a specificity  
determinant for Spodoptera exigua in different,  
but not all, Cry1-Cry1C hybrids", APPLIED

AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,  
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY,  
US, vol. 66, no. 4, 1 April 2000 (2000-04-01),  
pages 1559-1563, XP002480230, ISSN: 0099-2240,  
DOI:10.1128/AEM.66.4.1559-1563.2000, abstract;  
figure 1

WAGNER LUCENA ET AL.: "Molecular  
Approaches to Improve the Insecticidal Activity of  
Bacillus thuringiensis Cry Toxins", TOXINS, vol. 6,  
no. 8, 13 August 2014 (2014-08-13), pages 2393-2423,  
XP055238443, DOI: 10.3390/toxins6082393, abstract  
BRAVO A. ET AL.: "Mode of action of  
Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and  
their potential for insect control", TOXICON,  
ELMSFORD, NY, US, vol. 49, no. 4, 15 March 2007  
(2007-03-15), pages 423-435, XP026863362, ISSN:  
0041-0101 [retrieved on 2007-03-06], figure 2

LI LIANA PARDO-LÓPEZ ET AL.: "Bacillus  
thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins:  
mode of action, insect resistance and consequences  
for crop protection", FEMS MICROBIOLOGY  
REVIEWS, vol. 37, no. 1, 11 January 2013  
(2013-01-11), pages 3-22, XP055174115, ISSN:  
0168-6445, DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x,  
figures 3, 6

BAIG D.N. ET AL.: "cry Genes profiling  
and the toxicity of isolates of Bacillus thuringiensis  
from soil samples against American boll worm,  
Helicoverpa armigera", JOURNAL OF APPLIED  
MICROBIOLOGY, vol. 109, no. 6, December 2010  
(2010-12), pages 1967-1978, XP55243000, ISSN:  
1364-5072, tables 2, 3

WO-A2-9924581

WO-A1-2014055881

WO-A1-2011075588

WO-A1-0114562

WO-A1-2004020636

**(57)** Раскрыты нуклеотидные последовательности, которые кодируют новые химерные инсектицидные белки, проявляющие ингибирующую активность в отношении чешуекрылых. Конкретные варианты реализации изобретения обеспечивают композиции и трансформированные растения, части растений и семена, содержащие рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие один или более химерных инсектицидных белков.

### Ссылка на родственную заявку

В настоящей заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/064989, поданной 16 октября 2014 года, содержание которой в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Включение перечня последовательностей

Перечень последовательностей в машиночитаемой форме подан с этим заявлением в электронном формате и включен в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Перечень последовательностей содержится в файле, созданном 23 августа, 2016 года, с именем файла P34230WO00\_Seq\_PCT\_Art34.txt и размером 898,229 байт (как измерено в операционной системе MS-Windows®).

### Область техники

Изобретение в целом относится к области белков, обладающих ингибиторной активностью в отношении насекомых. В настоящей заявке описан новый класс химерных инсектицидных белков, обладающих ингибиторной активностью против сельскохозяйственных вредителей культурных растений и семян. В частности, раскрытый класс белков обладает инсектицидной активностью в отношении чешуекрылых насекомых-вредителей. Предлагаются растения, части растений и семена, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более описанных токсичных белков.

### Уровень техники

Все большее значение приобретает повышение урожайности сельскохозяйственных культур, в том числе кукурузы, сои, сахарного тростника, риса, пшеницы, овощей и хлопчатника. По прогнозам, в дополнение к растущей потребности в сельскохозяйственной продукции для обеспечения пищи, одеждой и обеспечения энергией растущего населения, климатическим последствиям и давлению со стороны растущего населения на использование земли, отличной от сельскохозяйственной, уменьшается количество доступных пахотных земель для ведения сельского хозяйства. Данные факторы привели к неоптимистичным прогнозам в отношении продовольственной безопасности, особенно в условиях отсутствия значительных улучшений в области биотехнологии растений и агрономических приемов. В свете данных факторов, экологически устойчивые усовершенствования в области технологий, агротехники и борьбы с вредителями являются жизненно важными инструментами для расширения производства сельскохозяйственных культур на ограниченном количестве пахотных земель, доступных для ведения сельского хозяйства.

Насекомые, особенно насекомые в пределах отряда чешуекрылых, считаются основной причиной повреждения полевых культур, тем самым снижая урожайность культур в зараженных районах. Виды чешуекрылых вредителей, которые имеют негативное влияние на сельское хозяйство, включают, без ограничений, кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малую (*Spodoptera exigua*), совку латуковую (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Chrysodeixis includens*), совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), совку клеверную (*Hypena scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*), мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), бабочку-огневку (*Amyeloides transitella*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), огневку подсолнечниковую (*Homoeosoma electellum*), точильщика зернового кукурузного (*Elasmopalpus lignosellus*), плодоядку яблонную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), листовертку восточную персиковую (*Grapholita molesta*), листовертку подсолнечника (*Suleima helianthana*), капустную моль (*Plutella xylostella*), розовый коробочный червь (*Pectinophora gossypiella*), розовый сверлильщик (*Sesamia inferens*), шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*), совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*), листовертку плодовых деревьев (*Archips argyrospila*), листовертку резанную золотистую (*Archips rosana*), огневку азиатскую стеблевую, или желтую рисовую огневку (*Chilo suppressalis*), листовертку рисовую (*Snaphalocrocis medinalis*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), мотылька травяного (*Crambus teterrellus*), огневку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), огневку сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), совку хлопковую египетскую (*Earias insulana*), совку пятнистую (*Earias vittella*), совку американскую (*Helicoverpa armigera*), американскую кукурузную совку, соевую совку или совку хлопковую (*Helicoverpa zea*), лугового мотылька (*Herprtoogramma licarsisalis*), гроздевую листовертку (*Lobesia botrana*), цитрусовую минирующую моль (*Phyllocnistis citrella*), белянку капустную (*Pieris brassicae*), репницу или белянку репную (*Pieris rapae*), азиатскую хлопчатниковую совку или азиатскую хлопковую совку (*Spodoptera litura*), и пасленовый минер (*Tuta absoluta*).

Исторически сложилось так, что синтетические химические инсектициды интенсивно применяли в качестве средства борьбы с вредителями в сельском хозяйстве. Озабоченность по поводу окружающей среды и здоровья человека, помимо возникающих проблем с устойчивостью, стимулировала исследования и разработку биологических пестицидов. Данное исследование привело к прогрессивному открытию и применению различных энтомопатогенных видов микроорганизмов, включая бактерии.

Парадигма биологических методов борьбы изменилась, когда был открыт потенциал энтомопатогенных бактерий, особенно бактерий, относящихся к роду *Bacillus*, и применен в разработке агентов для

биологической борьбы с вредителями. Штаммы бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) использовали в качестве источника инсектицидных белков, так как было обнаружено, что штаммы Bt проявляют высокую токсичность против конкретных насекомых. Известно, что штаммы Bt продуцируют дельта-эндотоксины, которые локализованы в параспоральном кристаллическом тельце включения в начале споруляции и во время фазы стационарного роста (например, белки Cry) и также известно, что они продуцирует секретлируемый инсектицидный белок. При проглатывании восприимчивым насекомым, дельта-эндотоксины, а также секретлируемые токсины оказывают свое действие на поверхность эпителия средней кишки, разрушают клеточную мембрану, приводя к разрушению и гибели клеток. Гены, кодирующие инсектицидные белки, также были идентифицированы у бактериальных видов, отличных от Bt, включая другие *Bacillus* и множество других видов бактерий, таких как *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("is" ранее известный как *Bacillus sphaericus*) и *Paenibacillus popilliae*.

Кристаллические и секретлируемые растворимые инсектицидные белковые токсины являются высокоспецифичными для их хозяев и получили мировое признание как альтернативы химическим инсектицидам. Например, инсектицидные токсичные белки применяют в различных сельскохозяйственных целях для защиты хозяйственно-ценных растений от заражения насекомыми, уменьшения потребности в применении химических пестицидов и повышения урожайности. Инсектицидные токсичные белки применяют для борьбы с сельскохозяйственными вредителями культурных растений механизированными способами, такими как распыление дисперсных микробных препаратов, содержащих различные штаммы бактерий, на поверхности растений, и с использованием способов генетической трансформации для получения трансгенных растений и семян, экспрессирующих инсектицидный токсичный белок.

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

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

Следовательно, существует настоятельная необходимость идентифицировать дополнительные инсектицидные белки с улучшенными инсектицидными свойствами, такими как повышенная эффективность против более широкого спектра целевых видов насекомых-вредителей и различные механизмы действия по сравнению с токсинами, применяемыми в настоящее время в агрономических приемах. Для удовлетворения данной потребности настоящее изобретение описывает новые химерные инсектицидные белки Cry1, которые проявляют активность против многочисленных целевых видов чешуекрылых вредителей.

Члены семейства кристаллических белков Cry1, известные в данной области техники, проявляют биологическую активность против чешуекрылых-вредителей. Форма предшественника кристаллических белков Cry1 состоит из двух сегментов примерно равных размеров. Карбоксиконцевая часть белка-предшественника, известная как сегмент протоксина, стабилизирует образование кристаллов и не проявляет инсектицидной активности. Аминоконцевая половина белка-предшественника содержит сегмент токсина белка Cry1 и, основываясь на выравнивании консервативных или по существу консервативных последовательностей в пределах членов семейства Cry1, может быть дополнительно разделена на три структурных домена: домен I, домен II и домен III. Домен I содержит около первой трети активного сегмента токсина и, как было показано, является существенным для формирования канала. Домены II и III вовлечены в связывание рецепторов и специфичны к видам насекомых, в зависимости от исследуемого насекомого и инсектицида.

Вероятность произвольного создания химерного белка с улучшенными свойствами из ассортимента доменных структур многочисленных нативных инсектицидных белков, известных в данной области техники, является незначительной. Это является результатом сложного характера структуры белка, олигомеризации и активации (включая соответствующий протеолитический процессинг химерного предшественника, если он экспрессирован в такой форме), необходимого для высвобождения сегмента инсектицидного белка. Только путем тщательного отбора протоксинов и конкретных мишеней в каждом исходном белке для создания химерной структуры могут быть созданы функциональные химерные инсекти-

цидные токсины, которые проявляют улучшенную инсектицидную активность по сравнению с исходными белками, из которых получены химеры. В данной области техники известно, что повторная сборка протоксина и токсинных доменов I, II и III любых двух или более токсинов, которые отличаются друг от друга, часто приводит к получению белков, которые проявляют дефектное образование кристаллов или у которых полностью отсутствует какая-либо детектируемая инсектицидная активность, направленная на предпочтительный вид насекомых-вредителей. Только метод проб и ошибок являются эффективными в получении инсектицидных химер, и даже в таком случае квалифицированный специалист не уверен, в конечном итоге, в химере, которая проявляет инсектицидную активность, которая эквивалентна или улучшена по сравнению с любым единственным исходным токсичным белком, из которого получены домены протоксина или токсинов химеры. Например, в литературе приводятся многочисленные примеры конструирования или сборки химерных белков из двух или более предшественников кристаллического белка. См., например, Jacqueline S. Knight et al., "A Strategy for Shuffling Numerous Bacillus thuringiensis Crystal Protein Domains." J. Economic Entomology, 97 (6) (2004): 1805-1813; Bosch et al. (патент США № 6204246); Malvar and Gilmer (патент США 6017534). В каждом из этих примеров многие из полученных химер не проявляли инсектицидных или кристаллообразующих свойств, которые были эквивалентны или улучшены по сравнению с белками-предшественниками, из которых были получены компоненты химер.

### Сущность изобретения

Предложены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют химерные инсектицидные белки, токсичные в отношении видов чешуекрылых-вредителей растений. Каждый из химерных инсектицидных белков может применяться по отдельности или в комбинации друг с другом и с другими инсектицидными белками и агентами, обладающими ингибиторной активностью в отношении насекомых, в препаратах и в условиях *in planta* (в растении); таким образом, обеспечивая альтернативы инсектицидным белкам и химикатам-инсектицидам, применяемым в настоящее время в сельскохозяйственных системах.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе описан химерный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей

SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23,  
25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63,  
65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95,  
97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111.

Данный химерный инсектицидный белок проявляет ингибирующую активность против видов насекомых отряда *Lepidoptera*, таких как, без ограничений

*Anticarsia gemmatalis*, *Diatraea saccharalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Pectinophora gossypiella*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitella*, *Helicoverpa gelotopen*, и *Rachiplusia nu*.

В другом варианте реализации изобретения полинуклеотид, кодирующий химерный инсектицидный белок, причем полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, и химерный инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей SEQ

ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41,  
43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75,  
77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105,  
107, 109 или 111.

Также рассматривается полинуклеотид, кодирующий химерный инсектицидный белок, причем полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая необязательно гибридизуется в строгих условиях с обратным комплементом полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из

SEQ ID

NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 или 130;

или кодирует химерный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111.

В других вариантах реализации изобретения в данном документе описана клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, указанный в любой из

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 или 130,

Причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки-хозяина или растительной клетки-хозяина. Рассматриваемые бактериальные клетки-хозяева включает *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, и *Erwinia*; и причем виды *Bacillus* представляют собой *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанный *Brevibacillus* представляет собой *Brevibacillus laterosporus*, и указанная *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*. Кроме того, предполагаемые растительные клетки-хозяева включают однодольные или двудольные растения.

Другие варианты реализации изобретения в данном документе описывают композиции, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащие химерный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, может дополнительно содержать по меньшей мере один агент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых, отличный от химерного инсектицидного белка. Рассматриваемые агенты, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, отличные от химерного инсектицидного белка, включают белок, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых, молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых, и химический состав, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых. Данные агенты, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых, отличные от химерного инсектицидного белка, могут проявлять активность в отношении одного или более видов вредителей из отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Homoptera*, или *Thysanoptera*.

В еще одном варианте реализации изобретения в данном документе описано семя, содержащее ингибирующе эффективное в отношении насекомых количество химерного инсектицидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей

SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111;

или полинуклеотид, указанный в любой из

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 или 130.

Рассматриваются также способы борьбы с чешуекрылыми вредителями, включающие стадию, в которой чешуекрылого вредителя приводят в контакт с ингибирующим количеством химерного инсектицидного белка согласно настоящему изобретению.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе описана трансгенная растительная клетка, растение или часть растения, содержащая химерный инсектицидный белок, причем химерный инсектицидный белок содержит любую аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111;

или химерный инсектицидный белок содержит белок, имеющий по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 21, 10; по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 28, по меньшей мере 87% идентичности с SEQ ID NO: 7; по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 4; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 13; по меньшей мере 64% идентичности с SEQ ID NO: 16; по меньшей мере 66% идентичности с SEQ ID NO: 19; по меньшей мере 86% идентичности с SEQ ID NO: 23; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 25; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 30; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 33; по меньшей мере 64% идентичности с SEQ ID NO: 36; по меньшей мере 66% идентичности с SEQ ID NO: 39; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 41; по меньшей мере 84% идентичности с SEQ ID NO: 43; по меньшей мере с 93% идентичности с SEQ ID NO: 45; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 47; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 50; или по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 53; или по меньшей мере 87% идентичности с SEQ ID NO: 85, 93, 105; или по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; или по меньшей мере 88% идентичности с SEQ ID NO: 91, 87, 89; или по меньшей мере 89% идентичности с SEQ ID NO: 107, 111; или по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 97; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 109; или по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 83; или по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 91 или 103; или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 95, 101; или по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 99. Также рассматриваются способы борьбы с чешуекрылыми-вредителями, включающие стадию в которой осуществляют воздействие вредителя на эту трансгенную растительную клетку, растение или часть растения, причем указанная растительная клетка, растение или часть растения экспрессирует ингибирующее в отношении чешуекрылых количество химерного инсектицидного белка.

В других вариантах реализации изобретения в данном документе предложены товарные продукты, полученные из растительной клетки, растения или части растения, причем продукт содержит обнаруживаемое количество химерного инсектицидного белка. Рассматриваемые товарные продукты включают растительную биомассу, масло, муку, корм для животных, муку, хлопья, отруби, пух, кожуры и обработанные семена.

Еще один способ, раскрытый в данном документе, представляет собой способ получения семени, содержащего химерный инсектицидный белок, включающий стадии, на которых высаживают по меньшей мере одно семя, содержащее химерный инсектицидный белок; выращивают растения из указанного семени; и собирают семя от растений, причем собранное семя содержит инсектицидный белок.

Рекомбинантные полинуклеотидные молекулы, кодирующие химерный инсектицидный белок, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 или 130;

и необязательно полинуклеотидную последовательность, кодирующую агент, обладающий ингибиторной активностью в отношении насекомых, отличный от химерного инсектицидного белка.

Другая рассматриваемая в данном документе молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидным сегментом, кодирующим химерные инсектицидные белки, причем химерный инсектицидный белок содержит любую аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 21, 10, 28,  
7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50,  
53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83,  
85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 или 111;

или химерный инсектицидный белок содержит белок, имеющий: по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 21, 10; по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 28; по меньшей мере 87% идентичности с SEQ ID NO: 7; по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 4; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 13; по меньшей мере 64% идентичности с SEQ ID NO: 16; по меньшей мере 66% идентичности с SEQ ID NO: 19; по меньшей мере 86% идентичности с SEQ ID NO: 23; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 25; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 30; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 33; по меньшей мере 64% идентичности с SEQ ID NO: 36; по меньшей мере 66% идентичности с SEQ ID NO: 39; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 41; по меньшей мере 84% идентичности с SEQ ID NO: 43; по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 45; по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 47; по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 50; или по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 53; или по меньшей мере 87% идентичности с SEQ ID NO: 85, 93, 105; или по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; или по меньшей мере 88% идентичности с SEQ ID NO: 91, 87, 89; или по меньшей мере 89% идентичности с SEQ ID NO: 107, 111; или по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 97; или по меньшей мере 91% идентичности с SEQ ID NO: 109; или по меньшей мере 93% идентичности с SEQ ID NO: 83; или по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 91, 103; или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 95, 101; или по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 99; или полинуклеотидный сегмент гибридизуется с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5,  
6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32,  
34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60,  
62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92,  
94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115,  
116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128,  
129 или 130.

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

#### **Краткое описание последовательностей**

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность рекомбинантной ДНК, кодирующую TIC1100, используемую для экспрессии в бактериальной клетке.

SEQ ID NO: 2 представляет собой синтетическую последовательность ДНК, кодирующую TIC1100, для экспрессии в растительной клетке.

SEQ ID NO: 3 представляет собой синтетическую последовательность ДНК, кодирующую TIC1100, для экспрессии в растительной клетке.

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность TIC1100.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность рекомбинантной ДНК, кодирующую TIC860, используемую для экспрессии в бактериальной клетке.

SEQ ID NO: 6 представляет собой синтетическую последовательность ДНК, кодирующую TIC860, для экспрессии в растительной клетке.

SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность TIC860.

SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность рекомбинантной ДНК, кодирующую TIC867, используемую для экспрессии в бактериальной клетке.

SEQ ID NO: 9 представляет собой синтетическую последовательность ДНК, кодирующую TIC867, для экспрессии в растительной клетке.

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность TIC867.

SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность рекомбинантной ДНК, кодирующую TIC867\_20, используемую для экспрессии в бактериальной клетке.

SEQ ID NO: 12 представляет собой синтетическую последовательность ДНК, кодирующую TIC867\_20 для экспрессии в растительной клетке.









клетке растения, кодирующей TIC843.

SEQ ID NO: 115 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC862.

SEQ ID NO: 116 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC1099.

SEQ ID NO: 117 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC1103.

SEQ ID NO: 118 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC845.

SEQ ID NO: 119 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC846.

SEQ ID NO: 120 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC858.

SEQ ID NO: 121 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC866.

SEQ ID NO: 122 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC838.

SEQ ID NO: 123 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC841.

SEQ ID NO: 124 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC842.

SEQ ID NO: 125 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC850.

SEQ ID NO: 126 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC859.

SEQ ID NO: 127 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC861.

SEQ ID NO: 128 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC848.

SEQ ID NO: 129 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC849.

SEQ ID NO: 130 представляет собой синтетическую последовательность ДНК для экспрессии в клетке растения, кодирующей TIC847.

#### **Подробное описание изобретения**

Проблема в области борьбы с сельскохозяйственными вредителями может быть охарактеризована как потребность в новых инсектицидных белках, которые эффективны против целевых вредителей, проявляя токсичность широкого спектра по отношению к целевым видам вредителей, способны экспрессироваться в растениях, не вызывая нежелательных агрономических проблем, и обеспечивают альтернативный способ воздействия по сравнению с существующими на сегодняшний день токсинами, которые используют в растениях в коммерческих целях. В данном документе описаны новые химерные инсектицидные белки и рассмотрена каждая из этих потребностей, в частности, в отношении широкого спектра чешуекрылых насекомых-вредителей.

Чтобы избежать развития резистентности насекомых к используемым в настоящее время инсектицидным белкам, устраняя их недостатки, необходимы новые инсектицидные белки с различными механизмами действия (МД), а также с широким спектром действия и эффективностью для борьбы с *Lepidoptera*. Одним из путей решения этой проблемы является обнаружение новых инсектицидных белков из различных биологических источников, предпочтительно из бактерий, грибов или растений. Другим подходом является перестановка сегментов между различными Vt-белками, которые демонстрируют структурное сходство для создания новых химерных Vt-белков, обладающих ингибирующими свойствами в отношении насекомых. Вероятность создания химерного белка с улучшенными свойствами рекомбинацией доменных структур многочисленных нативных инсектицидных кристаллических белков, известных в данной области техники, незначительна. См., например, Jacqueline S. Knight et al., "A Strategy for Shuffling Numerous Bacillus thuringiensis Crystal Protein Domains." *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): 1805-1813.

В данном документе описаны последовательности молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют новые химерные инсектицидные белки. Данные инсектицидные белки учитывают текущую потребность в данной области техники в разработке дополнительных токсичных инсектицидных белков с улучшенными инсектицидными свойствами, такими как повышенная эффективность против более широкого спектра целевых видов насекомых-вредителей и различных механизмов действия. Члены данной группы белков, включая приведенные в данном документе иллюстративные белки, проявляют инсектицидную активность в отношении видов чешуекрылых насекомых-вредителей.

Термин "сегмент" или "фрагмент" используется в настоящей заявке для описания непрерывных по-

следовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот, которые короче, чем полная аминокислотная или нуклеотидная последовательность, описывающая раскрытый химерный инсектицидный белок. Сегмент или фрагмент, проявляющий ингибирующую активность в отношении насекомых, также раскрыт в настоящей заявке, если выравнивание такого сегмента или фрагмента с соответствующим участком химерного инсектицидного белка приводит к идентичности аминокислотной последовательности любого процента фракции от около 65 до около 100% между сегментом или фрагментом и соответствующим участком химерного инсектицидного белка.

В контексте настоящей заявки термины "активная" или "активность", "пестицидная активность" или "пестицидная" или "инсектицидная активность", "ингибитор в отношении насекомых" или "инсектицидная" относятся к эффективности токсического агента, такого как инсектицидный белок, в ингибировании (ингибирование роста, питания, плодовитости или жизнеспособности), подавлении (подавление роста, кормления, плодовитости или жизнеспособности), контроле (контроль заражения насекомыми-вредителями, контроль интенсивности питания насекомых-вредителей на определенной культуре, содержащей эффективное количество инсектицидного белка), или уничтожении (вызывающие заболеваемость, смертность или снижение плодовитости) вредителя. Данные термины охватывают результат обеспечения пестицидно эффективного количества инсектицидного белка вредителю, причем воздействие инсектицидного белка на вредителя приводит к заболеваемости, смертности, снижению плодовитости или задержке роста. Данные термины также включают отпугивание вредителя от растения, ткани растения, части растения, семян, растительных клеток или от конкретного географического местоположения, причем растение может расти, в результате обеспечения пестицидно эффективного количества инсектицидного белка в или на растении. В общем, пестицидная активность относится к способности токсичного агента быть эффективным в ингибировании роста, развития, жизнеспособности, кормового поведения, брачного поведения, плодовитости или любого измеримого снижения, вызванного неблагоприятными эффектами, в связи с предоставлением в рацион насекомого данного белка, фрагмента белка, сегмента белка или полинуклеотида, конкретному целевому вредителю, включая, но не ограничиваясь ими, насекомых отряда *Lepidoptera*. Инсектицидный белок может быть получен растением или может быть применен к растению или к окружающей среде в том месте, где находится растение. Термины "биоактивность", "эффективный", "эффективный" или их вариации также являются терминами, взаимозаменяемо используемыми в настоящей заявке, для описания воздействия химерных инсектицидных белков согласно настоящему изобретению на целевых насекомых-вредителей.

Пестицидно эффективное количество токсического агента, обеспеченное в рационе целевого вредителя, проявляет пестицидную активность при контакте токсического агента с вредителем. Токсичным агентом может быть инсектицидный белок, или один или более химических агентов, известных в данной области техники. Инсектицидные химические агенты и инсектицидные белковые агенты можно применять по отдельности или в комбинации друг с другом. Химические агенты включают, без ограничений, молекулы дцРНК, нацеленные на специфические гены для подавления в целевом вредителе, органохлориды, органофосфаты, карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды и рианоиды. Инсектицидные белковые агенты включают химерные инсектицидные белки, представленные в настоящей заявке, а также другие белковые токсичные агенты, в том числе такие, которые нацелены на виды чешуекрылых-вредителей, а также белковые токсины, которые используются для борьбы с другими вредителями растений, такие как Сгу-белки, доступные в данной области техники для применения в борьбе с видами *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Hemiptera* и *Homoptera*.

Предполагается, что ссылка на вредителя, особенно вредителя сельскохозяйственного растения, охватывает вредителей культурных растений, особенно тех чешуекрылых-вредителей, которые контролируются описанными химерными инсектицидными белками. Однако ссылка на насекомого-вредителя может также включать насекомых-вредителей *Coleoptera*, *Hemiptera* и *Homoptera*, а также нематоды и грибы при тех условиях, когда токсичные агенты, нацеленные на этих вредителей, совместно локализируются или присутствуют вместе с химерным инсектицидным белком или белком, который имеет от около 65 до около 100% идентичности с химерным инсектицидным белком.

Химерные инсектицидные белки, описанные в данном документе, демонстрируют инсектицидную активность по отношению к насекомым-вредителям из видов чешуекрылых насекомых, включая взрослых особей, куколок, личинок и новорожденных, а также представителей отряда *Hemiptera*, включая взрослых особей и нимф. Насекомые отряда *Lepidoptera*, включая, без ограничений, совок луговых, совок, листоверток, и совок из семейства *Noctuidae*, например, кукурузную листовую совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малую (*Spodoptera exigua*), совку латуковую (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Pseudoplusia includens*), совку бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), совку клеверную (*Hypena scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*); точильщиков, чехлоносков, бабочек, дымчатых листоверток, гусениц бабочки капустницы и пироморфид из семейства *Pyrulidae*, например мотылька стеблевого кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), бабочку-огневку (*Amyeloides transitella*), кукурузную огневку (*Crambus caliginosellus*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), огневку подсолнечниковую (*Homoeosoma electellum*), точильщика

зернового кукурузного (*Elasmopalpus lignosellus*); листоверток, огневков Шишковых, плодояжорок, и плодовых листоверток из семейства Tortricidae, например плодояжорку яблонную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), листовертку восточную персиковую (*Grapholita molesta*), листовертку подсолнечника (*Suleima helianthana*); и многих других экономически важных представителей отряда Lepidoptera, например капустную моль (*Plutella xylostella*), розового коробочного червя (*Pectinophora gossypiella*) и шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Другие насекомые-вредители отряда Lepidoptera включает, например, *Alabama argillacea* (совка хлопковая американская), *Archips argyrosipila* (листовертка плодовых деревьев), *Archips rosana* (листовертка резанная золотистая) и другие виды *Archips*, *Chilo suppressalis* (огневка азиатская стеблевая или желтая рисовая огневка), *Spinalocrocis medinalis* (листовертка рисовая), *Crambus caliginosellus* (кукурузная огневка), *Crambus teterrellus* (мотылек травяной), *Diatraea grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная), *Diatraea saccharalis* (огневка сахарного тростника), *Earias insulana* (совка хлопковая египетская), *Earias vittella* (совка пятнистая), *Helicoverpa armigera* (совка американская), *Helicoverpa zea* (совка хлопковая или американская кукурузная совка), *Heliothis virescens* (табачная листовертка), *Herpetogramma licarsalis* (луговой мотылек), *Lobesia botrana* (гроздевая листовертка), *Phyllocnistis citrella* (цитрусовая мирующая моль), *Pieris brassicae* (белянка капустная), *Pieris rapae* (репница или белянка репная), *Plutella xylostella* (капустная моль), *Spodoptera exigua* (совка малая), *Spodoptera litura* (азиатская хлопчатниковая совка, азиатская хлопковая совка) и *Tuta absoluta* (пасленовый минер).

В контексте настоящей заявки термин "изолированная молекула ДНК" или эквивалентный термин или фраза означает, что молекула ДНК представляет собой молекулу ДНК, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не в ее естественной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, не транскрибируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, терминирующая последовательность транскрипции и т.п., которые, естественно, находятся в ДНК генома организма, не считаются "выделенными" до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природе. Тем не менее, каждый из этих элементов и их части были бы "выделены" в рамках настоящего раскрытия при условии, если элемент находится внутри генома организма и в том месте в геноме, в котором он естественным образом находится. Точно так же нуклеотидная последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет представлять собой выделенную нуклеотидную последовательность, если нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, в которой естественным образом находится последовательность, кодирующая белок. Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность природного инсектицидного белка, будет считаться выделенной для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия любая трансгенная нуклеотидная последовательность, т.е. нуклеотидная последовательность ДНК, вставленная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, считается выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она внутри плазмиды или подобной структуры, используемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии или присутствует в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из растения или бактерии.

Как описано далее в примерах, при помощи химерогенеза из доменов протоксина и токсина известных инсектицидных токсинов (называемые в данном документе "исходные белки") сконструировали около восьмисот сорок четыре (844) нуклеотидных последовательностей, которые кодируют химерные инсектицидные белки, и экспрессировали и проводили испытание в биотесте на активность в отношении чешуекрылых. Небольшое количество сконструированных химерных инсектицидных белков продемонстрировало повышенную активность в отношении чешуекрылых или усиленный спектр в отношении чешуекрылых по сравнению с исходными белками, из которых были получены его токсинные компоненты.

Данные новые химерные инсектицидные белки с повышенной активностью в отношении чешуекрылых или усиленным спектром в отношении чешуекрылых были сконструированы из следующих протоксина и токсина доменов исходных инсектицидных белков: Cry1Ah (домен I), Cry1Bb1 (домены I и II), Cry1Be2 (домены I и II), Cry1Ja1 (домены I и II), Cry1Fa1 (домены I и II), Cry1Ac (домен II и протоксин), Cry1Ca (домен III и протоксин), Cry1Ka (домен III и протоксин), Cry1Jx (домен III), Cry1Ab (домен III), Cry1Ab3 (протоксин), Cry1Da1 (протоксин), Cry4 (протоксин), Cry9 (протоксин), Cry1Be (протоксин) и Cry1Ka (протоксин).

В частности, новые химерные инсектицидные белки согласно настоящему изобретению с повышенной активностью в отношении чешуекрылых или усиленным спектром чешуекрылых включают следующие комбинации протоксина и доменов: TIC1100/SEQ ID NO: 4 (домен I-Cry1Ah, домен II-Cry1Ac, домен III-Cry1Ca, протоксин-Cry1Ac), TIC860/SEQ ID NO: 7 (домен I-Cry1Bb1, домен II-Cry1BB1, домен III-Cry1Ca, протоксин-Cry1Ac), TIC867/SEQ ID NO: 10 (домен I-Cry1Be2, домен II-Cry1Be2, домен III-Cry1Ka, протоксин-Cry1Ab3), TIC868/SEQ ID NO: 28 (домен I-Cry1Be2, домен II-Cry1Be2 и домен III-Cry1Ca, протоксин-Cry1Ab3), TIC869/SEQ ID NO: 50 (домен I-Cry1Ja1, домен II-Cry1Ja1, домен III-

Cry1Jx, протоксин-Cry1Ab3) и TIC836/SEQ ID NO: 53 (домен I-Cry1Fa1, домен II-Cry1Fa1, домен III-Cry1Ab, протоксин-Cry1Ac).

Варианты, в которые вводили аминокислотные замены или альтернативные протоксиновые домены, также были конструированы для химерных инсектицидных белков TIC867 и TIC868. В частности, данные варианты TIC867 и TIC868 включают следующие аминокислотные замены или альтернативные протоксиновые домены: TIC867\_20/SEQ ID NO: 13 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Da1), TIC867\_21/SEQ ID NO: 16 (альтернативный протоксиновый домен Cry4), TIC867\_22/SEQ ID NO: 19 (альтернативный протоксиновый домен Cry9), TIC867\_23/SEQ ID NO: 21 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Be), TIC867\_24/SEQ ID NO: 23 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Ka), TIC867\_25/SEQ ID NO: 25 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Ka), TIC868\_9/SEQ ID NO: 30 (аминокислотная модификация N240S\_Y343Q\_N349T), TIC868\_10/SEQ ID NO: 33 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Da1), TIC868\_11/SEQ ID NO: 36 (альтернативный протоксиновый домен Cry4), TIC868\_12/SEQ ID NO: 39 (альтернативный домен протоксина Cry9), TIC868\_13/SEQ ID NO: 41 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Be), TIC868\_14/SEQ ID NO: 43 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Ka), TIC868\_15/SEQ ID NO: 45 (альтернативный протоксиновый домен Cry1Ca) и TIC868\_29/SEQ ID NO: 47 (модификация аминокислоты Q136Y\_Y343Q\_N349T).

Как продемонстрировано в примерах, у каждого из этих вариантов TIC867 и TIC868 изменена активность в отношении чешуекрылых и/или снижен спектр активности исходного химерного инсектицидного белка в отношении чешуекрылых, указывая, таким образом, на то, что альтернативный протоксиновый домен и аминокислотные замены имели прямое влияние на инсектицидную активность и спектр химерных инсектицидных белков TIC867 и TIC868.

Многие из химерных инсектицидных белков демонстрируют инсектицидную активность в отношении многочисленных видов чешуекрылых насекомых-вредителей. В частности, новые химерные инсектицидные белки, раскрытые в настоящей заявке, проявляют активность в отношении одного или более из следующих чешуекрылых насекомых-вредителей: совки бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), огневки сахарного тростника (SCB, *Diatraea saccharalis*), точильщика зернового кукурузного (LSCB, *Elaasmopalpus lignosellus*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), соевой совки (SPW, *Helicoverpa zea*), совки хлопковой (CBW, *Helicoverpa zea*), табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), черной совки (BLAW, *Spodoptera cosmioidea*), южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совки малой (BAW, *Spodoptera exigua*), совки американской (OBW, *Helicoverpa armigera*), азиатской хлопковой совки (OLW, *Spodoptera litura*), розового коробочного червя (PBW, *Pectinophora gossypiella*), огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*), шиповатого северного коробочного червя (SBW, *Earias vitella*), южноамериканской совки (SABW, *Helicoverpa gelotopon*), и пяденицы подсолнечниковой (SFL, *Rachiplusia nu*). Таким образом, иллюстративные белки, описанные в настоящей заявке, связаны общей функцией и проявляют инсектицидную активность в отношении видов насекомых-вредителей из отряда Lepidoptera, включая взрослых особей, личинок и куколок.

Белки, которые напоминают химерные инсектицидные белки, могут быть идентифицированы путем сравнения друг с другом с использованием различных компьютерных алгоритмов, известных в данной области техники. Например, идентичность аминокислотных последовательностей белков, связанных с химерными инсектицидными белками, может быть проанализирована с использованием выравнивания Clustal W с использованием этих параметров по умолчанию: матрица сравнения: весы, штраф на внесение делеции в выравнивание: 10,0, штраф на продолжение делеции: 0,05, гидрофильные делеции: вкл, гидрофильные остатки: GPSNDQERK, штраф на остаткоспецифические делеции: вкл (Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680). Процент идентичности аминокислот далее рассчитывают в виде выражения: 100% умноженные на (идентичность аминокислот/длина заявленного белка). Другие алгоритмы выравнивания, также доступные в данной области техники, обеспечивают результаты, аналогичные результатам, полученным с использованием выравнивания Clustal W, и рассмотрены в настоящей заявке.

Предполагается, что искомым белком, проявляющий ингибирующую активность в отношении насекомых, раскрыт в настоящей заявке, если выравнивание такого искомого белка с исследуемыми химерными инсектицидными белками, указанными в

SEQ

ID NO: 4, 7, 10, 13, 16, 19, 21, 23, 25, 28, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 и 111 дает в результате по меньшей мере около 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 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%, 99% или около 100%

идентичности аминокислотной последовательности (или любой процент в данном диапазоне) между искомым и исследуемым белком.

Как описано далее в примерах настоящей заявки, синтетические или искусственные последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, были сконструированы для применения в растениях. Иллюстративные синтетические нуклеотидные последовательности, которые были сконструированы для применения в растениях, указаны в

SEQ ID NO: 2 и 3

(TIC1100), SEQ ID NO: 6 (TIC860), SEQ ID NO: 9 (TIC867), SEQ ID NO: 12 (TIC867\_20), SEQ ID NO: 15 (TIC867\_21), SEQ ID NO: 18 (TIC867\_22), SEQ ID NO: 20 (TIC867\_23), SEQ ID NO: 22 (TIC867\_24), SEQ ID NO: 24 (TIC867\_25), SEQ ID NO: 27 (TIC868), SEQ ID NO: 29 (TIC868\_9), SEQ ID NO: 32 (TIC868\_10), SEQ ID NO: 35 (TIC868\_11), SEQ ID NO: 38 (TIC868\_12), SEQ ID NO: 40 (TIC868\_13), SEQ ID NO: 42 (TIC868\_14), SEQ ID NO: 44 (TIC868\_15), SEQ ID NO: 46 (TIC868\_29), SEQ ID NO: 49 (TIC869) и SEQ ID NO: 52 (TIC836), SEQ ID NO: 112 и 113 (TIC713), SEQ ID NO: 114 (TIC843), SEQ ID NO: 115 (TIC862), SEQ ID NO: 116 (TIC1099), SEQ ID NO: 117 (TIC1103), SEQ ID NO: 118 (TIC845), SEQ ID NO: 119 (TIC846), SEQ ID NO: 120 (TIC858), SEQ ID NO: 121 (TIC866), SEQ ID NO: 122 (TIC838), SEQ ID NO: 123 (TIC841), SEQ ID NO: 124 (TIC842), SEQ ID NO: 125 (TIC850), SEQ ID NO: 126 (TIC859), SEQ ID NO: 127 (TIC861), SEQ ID NO: 128 (TIC848), SEQ ID NO: 129 (TIC849), и SEQ ID NO: 130 (TIC847).

Для экспрессии в растительных клетках химерные инсектицидные белки могут экспрессироваться так, чтобы они находились в цитозоле или были нацелены на различные органеллы растительной клетки. Например, нацеливание белка на хлоропласт может приводить к увеличению уровней экспрессированного белка в трансгенном растении, предотвращая появление признаков иных фенотипов. Нацеливание может также приводить к повышению резистентности к вредителям у трансгенного объекта. Целевой пептид или транзитный пептид представляет собой короткую пептидную цепь (длиной 3-70 аминокислот), которая направляет перенос белка в определенную область клетки, включая ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭР), хлоропласт, апопласт, пероксисому и плазматическую мембрану. Некоторые сигнальные пептиды отщепляются от белка под действием сигнальной пептидазы после транспортирования белков. Для нацеливания на хлоропласт, белки содержат транзитные пептиды, которые содержат около 40-50 аминокислот. Для описания применения хлоропластных транзитных пептидов, см. патенты США № 5188642 и 5728925. Многие локализованные на хлоропласте белки экспрессируются из ядерных генов как предшественники и нацелены на хлоропласт транзитным пептидом хлоропласта (ТПХ). Примеры таких выделенных хлоропластных белков включают, без ограничений, такие, которые связаны с малой субъединицей (МСУ) рибулозо-1,5,-бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксином, ферредоксин-оксидоредуктазой, белком I и белком II светособирающего комплекса, тиоредоксином F, еноллируют шикимат фосфатсинтазой (ЕПШФС) и транзитными пептидами, описанными в патенте США № 7193133. В условиях *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что нехлоропластные белки могут быть нацелены на хлоропласт с использованием белковых гибридов с гетерологичным ТПХ и что наличия ТПХ достаточно для нацеливания белка на хлоропласт. Включение подходящего хлоропластного транзитного пептида, такого как ЕПШФС ТПХ *Arabidopsis thaliana* (ТПХ2) (см. Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210:437-442, 1987) или ЕПШФС ТПХ *Petunia hybrid* (ТПХ4) (см., della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83: 6873-6877, 1986) было показано, что они нацеливают гетерологичные последовательности белка

ЕПШФС на хлоропласты в трансгенных растениях (см., патенты США № 5627061, 5633435 и 5312910 и EP 0218571, EP 189707, EP 508909 и EP 924299). Для нацеливания химерных инсектицидных белков на хлоропласт, последовательность, кодирующая транзитный пептид хлоропласта, расположена 5' в функциональной связи и в рамке к синтетической кодирующей последовательности, кодирующей химерный инсектицидный белок, который был сконструирован для оптимальной экспрессии в растительных клетках.

Экспрессионные кассеты и векторы, содержащие данные синтетические или искусственные нуклеотидные последовательности, конструировали и вводили в клетки растений кукурузы, хлопка и сои в соответствии со способами и методиками трансформации, которые известны в данной области техники. Трансформированные клетки регенерировали в трансформированные растения, которые, как было обнаружено, экспрессировали химерный инсектицидный белок. Для проверки пестицидной активности биотестирование проводили в присутствии личинок чешуекрылых-вредителей с использованием дисков листьев растений, полученных из трансформированных растений. Рассматриваются композиции молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют химерные инсектицидные белки. Например, химерные инсектицидные белки могут быть экспрессированы конструктами рекомбинантной ДНК, в которых молекула полинуклеотида с ORF, кодирующим химерный инсектицидный белок, функционально связана с генетическими экспрессионными элементами, такими как промотор и любым другим регуляторным элементом, необходимым для экспрессии в системе, для которых предназначен конструкт. Неограничивающие примеры включают растительный функциональный промотор функционально связанный с синтетическим химерным инсектицидным белком, кодирующим последовательности, для экспрессии химерного инсектицидного белка в растениях, или *Vt*-функциональный промотор функционально связанный с последовательностью, кодирующей химерный инсектицидный белок, для экспрессии белка в *Vt* бактерии или в другом *Bacillus*. Другие элементы могут быть функционально связаны с последовательностями, кодирующими химерные инсектицидные белки, включая, без ограничений, энхансеры, интроны, нетранслируемые лидеры, кодированные белковые иммобилизационные метки (гистидиновая метка), транслокационные пептиды (т.е. пластидные транзитные пептиды, сигнальные пептиды), полипептидные последовательности для посттрансляционных модифицирующих ферментов, сайты связывания рибосом и сайты-мишени РНКи.

Приведенные в документе примеры рекомбинантных полинуклеотидных молекул включают, без ограничений, гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, таким как

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11,  
12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37,  
38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,  
68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98,  
100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118,  
119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 и 130,

который кодирует полипептид или белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в

SEQ ID NO: 4 (TIC1100), 7  
(TIC860), 10 (TIC867), 13 (TIC867\_20), 16 (TIC867\_21), 19  
(TIC867\_22), 21 (TIC867\_23), 23 (TIC867\_24), 25 (TIC867\_25), 28  
(TIC868), 30 (TIC868\_9), 33 (TIC868\_10), 36 (TIC868\_11), 39  
(TIC867\_12), 41 (TIC867\_13), 43 (TIC867\_14), 45 (TIC867\_15), 47  
(TIC867\_29), 50 (TIC869), 53 (TIC836), 55 (TIC713), 57 (TIC843),  
59 (TIC862), 61 (TIC1099), 63 (TIC1099-T507E), 65 (TIC1099-  
R522K), 67 (TIC1099-K490S), 69 (TIC1099-T562R), 71 (TIC1099-  
S533R), 73 (TIC1099-G498D), 75 (TIC1099-K490A), 77 (TIC1099-  
E564A), 79 (TIC1103), 81 (TIC1101), 83 (TIC845), 85 (TIC846), 87  
(TIC858), 89 (TIC865), 91 (TIC866), 93 (TIC838), 95 (TIC839), 97  
(TIC841), 99 (TIC842), 101 (TIC850), 103 (TIC859), 105 (TIC861),  
107 (TIC848), 109 (TIC849) и 111 (TIC847).

Гетерологичный промотор также может быть функционально связан с синтетическими кодирующими последовательностями ДНК, кодирующими химерный инсектицидный белок, нацеленный на пластиду, и ненацеленный химерный инсектицидный белок. Предполагается, что кодоны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие химерный инсектицидный белок, описанный в данном документе, могут быть заменены синонимичными кодонами (известны в данной области техники как молчащие замены).



Молекула рекомбинантной ДНК или конструктор, содержащий последовательность, кодирующую химерный инсектицидный белок, может дополнительно содержать область ДНК, которая кодирует один или более токсичных агентов, которые могут быть сконструированы для одновременной экспрессии или совместной экспрессии с последовательностью ДНК, кодирующей химерный инсектицидный белок, отличный от химерного инсектицидного белка, молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью в отношении насекомых, или вспомогательный белок. Вспомогательные белки включают, без исключений, кофакторы, ферменты, партнеры по связыванию или другие агенты, которые способствуют повышению эффективности агента, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, например, способствуя его экспрессии, влияя на его стабильность в растениях, оптимизируя свободную энергию для олигомеризации, увеличивая его токсичность и увеличивая спектр его активности. Вспомогательный белок может облегчать захват одного или более агентов, обладающих ингибирующей активностью в отношении насекомых, например, или усиливать токсическое действие токсического агента.

Молекулу или конструктор рекомбинантной ДНК можно собирать так, чтобы все белки или молекулы дцРНК экспрессировали из одного промотора, или каждый белок или молекулу дцРНК экспрессировали под контролем отдельного промотора, или в определенной их комбинации. Белки согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы из мультигенной экспрессирующей системы, в которой химерный инсектицидный белок экспрессируется из общего нуклеотидного сегмента, который также содержит другие открытые рамки считывания и промоторы, в зависимости от выбранного типа экспрессирующей системы. Например, бактериальная мультигенная экспрессирующая система может использовать единственный промотор для управления экспрессией множественных/тандемных открытых рамок считывания из одного оперона (то есть, полицистронная экспрессия). В другом примере растительная мультигенная экспрессирующая система может использовать многократно несвязанные экспрессионные кассеты, каждая из которых экспрессирует другой белок или другой токсичный агент, такой как одна или более молекул дцРНК.

Рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты или конструкции рекомбинантной ДНК, содержащие последовательность, кодирующую химерный инсектицидный белок, могут быть доставлены в клетки-хозяева векторами, например, плазмидой, бакуловирусом, синтетической хромосомой, вирионом, космидой, фагемидой, фагом или вирусным вектор. Такие векторы могут быть использованы для достижения стабильной или транзиторной экспрессии последовательности, кодирующей химерный инсектицидный белок, в клетке-хозяине, или более поздней экспрессии кодируемого полипептида. Экзогенный рекомбинантный полинуклеотид или конструктор рекомбинантного ДНК, которая содержит последовательность, кодирующую химерный инсектицидный белок, и которая вводится в клетку-хозяина, упоминаемая в данном документе как "трансген".

В данном документе предложены трансгенные бактерии, трансгенные растительные клетки, трансгенные растения и части трансгенных растений, которые содержат полинуклеотид, который кодирует любой один или более химерных инсектицидных белков. Термин "бактериальная клетка" или "бактерия" может включать, без ограничений, клетку *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* или *Rhizobium*. Термин "растительная клетка" или "растение" может включать, без ограничений, клетку двудольного растения или клетку однодольного растения. Рассматриваемые растения и растительные клетки включают, без ограничений, клетку или растение люцерны, банана, ячменя, бобов, брокколи, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокосовой пальмы, клевера, хлопчатника, тыквы, огурца, ели Дугласа, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата, сосны Лоблолли, просо, дыни, грецкого ореха, овса, гороха, арахиса, перца, голубиного гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, злака, ржи, американского шафрана, кустарник, сорго, южной сосны, сои, шпината, кабачка, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, просо, чая, табака, томата, тритикале, дерновой травы, арбуза, пшеницы. В некоторых вариантах реализации изобретения представлены трансгенные растения и части трансгенных растений, которые регенерировали из трансгенной растительной клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения трансгенные растения могут быть получены из трансгенного семени путем разрезания, срывания, измельчения или иного отделения части от растения. В определенных вариантах реализации изобретения часть растения может быть семенем, коробочкой, листом, цветком, стеблем, корнем или любой его частью или невозстанавливаемой частью трансгенной части растения. Как используется в данном контексте, "нерегенерируемая" часть трансгенной части растения представляет собой часть, которая не может быть индуцирована для образования целого растения или которая не может быть индуцирована для образования целого растения, способного к половому и/или бесполому размножению. В некоторых вариантах реализации изобретения нерегенерируемая часть отбираемой части растения представляет собой часть трансгенного семени, коробочки, листа, цветка, стебля или корня.

Приведены способы получения трансгенных растений, которые содержат ингибирующее в отношении насекомых *Lepidoptera* количество химерных инсектицидных белков. Такие растения могут быть получены путем введения полинуклеотида, который кодирует химерные инсектицидные белки, предусмотренные в этой заявке, в растительную клетку и выбирает растение, полученное из указанной расти-

тельной клетки, которое экспрессирует ингибирующее в отношении насекомых или *Lepidoptera* количество инсектицидного вещества. Растения могут быть получены из растительных клеток путем регенерации семян, пыльцы или меристемы, полученных способами трансформации. Способы трансформации растений известны в данной области техники. Например, трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, описана в публикациях патентной заявки США 2009/0138985 A1 (соя), 2008/0280361 A1 (соя), 2009/0142837 A1 (кукуруза), 2008/0282432 (хлопчатник) и 2008/0256667 (хлопчатник).

Растения, экспрессирующие химерные инсектицидные белки, можно скрещивать путем селекции с трансгенными объектами, экспрессирующими другие инсектицидные белки и/или экспрессирующими другие трансгенные признаки, такие как другие признаки для борьбы с насекомыми, гены устойчивости к гербицидам, гены, повышающие урожайность или устойчивость к стрессу, и т.п. или признаки могут быть объединены в один вектор, так что все признаки будут связаны между собой.

Обработанные растительные продукты, причем процессированный продукт содержит обнаруживаемое количество химерного инсектицидного белка, сегменты и фрагменты, обладающие ингибиторной активностью в отношении насекомых, или его фрагмент или любую его отличительную часть, также раскрыты в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации изобретения обработанный продукт выбирают из группы, состоящей из частей растения, биомассы растений, масла, муки, сахара, корма для животных, муки, хлопьев, отрубей, волокна, шелухи обработанных семян и семян. В определенных вариантах реализации изобретения обработанный продукт является нерегенерируемым. Растительный продукт может включать товарные или другие коммерческие продукты, полученные из трансгенного растения или части трансгенных растений, причем товарные или другие продукты можно отследить путем обнаружения нуклеотидных сегментов или экспрессированных РНК или белков, которые кодируют или содержат отличные части химерного инсектицидного белка.

Также в настоящей заявке раскрыты способы борьбы с насекомыми, в частности, заражениями культурных растений чешуекрылыми насекомыми с использованием химерных инсектицидных белков. Такие способы могут включать выращивание растения, содержащего ингибирующее в отношении насекомых *Lepidoptera* количество химерного инсектицидного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения такие способы могут дополнительно включать любое одно или более из: (I) нанесения любой композиции, содержащей или кодирующей химерный инсектицидный белок, на растение или семя, которое дает начало растению; и (II) трансформацию растения или растительной клетки, которые дают начало растению с полинуклеотидом, кодирующим химерный инсектицидный белок. В общем, предполагается, что химерный инсектицидный белок может быть обеспечен в композиции, имеющейся в микроорганизме, или имеющейся в трансгенном растении, чтобы обеспечить ингибирующую активность против чешуекрылых насекомых.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный инсектицидный белок является инсектицидно активным ингредиентом композиции, обладающей ингибирующей активностью в отношении насекомых, полученной культивированием рекомбинантного *Bacillus* или любой другой рекомбинантной бактериальной клетки, трансформированной для экспрессии химерного инсектицидного белка в условиях, подходящих для экспрессии. Такая композиция может быть получена путем высушивания, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, седиментации или концентрирования культуры таких рекомбинантных клеток, экспрессирующих/продуцирующих химерный инсектицидный белок. Такой процесс может приводить к образованию клеточного экстракта, клеточной суспензии, клеточного гомогената, клеточного лизата, клеточного супернатанта, клеточного фильтрата или клеточного осадка из *Bacillus* или других энтомопатогенных бактерий. Получив сконструированный инсектицидный белок, таким образом, создают композицию, которая содержит сконструированный инсектицидный белок, может содержать бактериальные клетки, бактериальные споры, а также параспоральные тельца и может поставляться для различных применений, включая продукты-спреи, обладающие ингибирующей активностью в отношении сельскохозяйственных насекомых или препараты кормовой биомассы, обладающие ингибирующей активностью в отношении насекомых в кормовых биотестах.

Вышеупомянутое соединение или препарат может дополнительно содержать сельскохозяйственно приемлемый носитель, такой как приманка, порошок, пыль, таблетки, гранулы, спрей, эмульсия, коллоидная суспензия, водный раствор, споры *Bacillus* или кристаллические препараты или обработанные семена. Соединение или препарат также могут дополнительно содержать рекомбинантную растительную клетку, растительную ткань, семена или растение, трансформированные для экспрессии одного или более белков; или бактерии, трансформированные для экспрессии одного или более белков. В зависимости от уровня ингибирования в отношении насекомых или инсектицидного ингибирования, присущего рекомбинантному полипептиду, и уровня соединения или препарата, который должен применяться в анализе растений или рациона, соединение или препарат могут содержать различные массовые количества рекомбинантного полипептида, например, от 0,0001 до 0,001, до 0,01, до 1, до 99% от массы рекомбинантного полипептида.

В варианте реализации изобретения для снижения вероятности развития резистентности, композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, или трансгенное растение, содержащее химерный инсектицидный белок, может дополнительно содержать по меньшей мере один до-

полнительный токсический агент, который проявляет ингибирующую активность против тех же видов чешуекрылых насекомых, но который отличается от химерного инсектицидного белка. Возможные дополнительные токсичные агенты для такой композиции содержат белок, обладающий ингибирующей активностью против насекомых, и молекулу дцРНК, обладающую ингибирующей активностью против насекомых. Один пример использования таких рибонуклеотидных последовательностей для борьбы с насекомыми-вредителями описан в Baum, et al. (публикация патента США 2006/0021087 A1). Такой дополнительный полипептид(ы) для борьбы с чешуекрылыми-вредителями может быть выбран из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, такого как, без ограничений, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (публикация патента США 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), химеры Cry1D, Cry1E, Cry1F и Cry1A/F (патенты США № 7070982, 6962705 и 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (патент США № 7064249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, VIP3A, VIP3Ab, VIP3B, VIP3V, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 и AXMI-045 (публикация патента США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (публикация патента США 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (публикация патента США 2013-0104259 A1), AXMI-134 (публикация патента США 2013-0167264 A1), AXMI-150 (публикация патента США 2010-0160231 A1), AXMI-184 (публикация патента США 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (публикация патента США 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (публикация патента США 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (публикация патента США 20140196175 A1), AXMI-238 (публикация патента США 2014-0033363 A1), AXMI-270 (публикация патента США 20140223598 A1), AXMI-345 (публикация патента США 20140373195 A1), DIG-3 (публикация патента США 20130219570 A1), DIG-5 (публикация патента США 20100317569 A1), DIG-11 (публикация патента США 20100319093 A1), AfIP-1A и его производные (публикация патентной заявки США 2014-0033361 A1), AfIP-1B и его производные (публикация патента США 20140033361 A1), PIP-1A/PIP-1B (публикация патента США 20140007292 A1), PSEEN3174 (публикация патента США 20140007292 A1), AECFG-592740 (публикация патента 20140007292 A1), Pput\_1063 (публикация патента США 20140007292 A1), Pput\_1064 (публикация патента США 20140007292 A1), GS-135 и его производные (публикация патента США 20120233726 A1), GS153 и его производные (публикация патента США 20120192310 A1), GS154 и его производные (публикация патента США 20120192310 A1), GS155 и его производные (публикация патента 20120192310 A1), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20120167259 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20120047606 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20110154536 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20110112013 A1, SEQ ID NO: 2 и 4, и ее производные, как описано в публикации патента США 20100192256 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20100077507 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20100077508 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в публикации патента США 20090313721 A1, SEQ ID NO: 2 или 4, и их производных, как описано в публикации патента США 20100269221 A1, SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патенте США № 7772465 (B2), CF161\_0085 и его производные, как описано в WO 2014/008054 A2, токсичные белки к чешуекрылым насекомым и их производные, как описано в патенте США US 20080172762 A1, US 201110055968 A1 и US 20120117690 A1; SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в US 7510878 (B2), SEQ ID NO: 2 и ее производные, как описано в патенте США № 7812129 (B1); и тому подобное.

В других вариантах реализации изобретения композиция или трансгенное растение, обладающее ингибирующей активностью в отношении насекомых, может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный токсический агент, который проявляет ингибирующую активность в отношении насекомых-вредителей, которые не ингибируются химерными инсектицидными белками согласно настоящему изобретению (такие насекомые-вредители как жесткокрылые, полужесткокрылые и равнокрылые) с тем, чтобы расширить спектр ингибирующей активности в отношении насекомых.

Такой дополнительный токсичный агент для борьбы с жесткокрылыми насекомыми-вредителями может быть выбран из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, такого как, без ограничений, Cry3Bb (патент США № 6501009), варианты Cry1C, варианты Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (публикация патента США 20130167264 A1) AXMI-184 (публикация патента США 20100004176 A1), AXMI-205 (публикация патента США 20140298538 A1), axmi207 (публикация патента США 20130303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (публикация патента США 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (публикация патента США 20140196175 A1), AXMI-279 (публикация патента США 20140223599 A1), AXMI-R1 и их варианты (публикация патента США 20100197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (публикация патента США 20100319092 A1), eNIPs (публикация патентной заявки США 2010/0017914) IP3 и его варианты (публикация патента США 20120210462 A1) и  $\phi$ -гексатоксин-Nv1a (публикация патентной заявки US 20140366227 A1).

Такой дополнительный токсичный агент для борьбы с полужесткокрылыми-вредителями может

быть выбран из группы, состоящей из белков, активных в отношении полужесткокрылых, таких как, без ограничений, T1C1415 (публикация патента США 20130097735 A1), T1C807 (патент США № 8609936), T1C834 (публикация патента США 20130269060 A1), АХМ1-036 (публикация патента США 20100137216 A1) и АХМ1-171 (публикация патента США 20130055469 A1). Дополнительные полипептиды для борьбы с жесткокрылыми, чешуекрылыми и равнокрылыми насекомыми-вредителями можно найти на сайте номенклатуры токсинов *Bacillus thuringiensis*, находящемся в ведении Нилом Крикмором (во всемирной паутине по адресу [btnomenclature.info](http://btnomenclature.info)).

Последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, и последовательности, имеющие значительную процентную идентичность с химерными инсектицидными белками, можно идентифицировать с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), термическая амплификация и гибридизация. Например, химерные инсектицидные белки могут быть использованы для получения антител, которые специфически связываются с белками, и могут быть использованы для скрининга и поиска других белков, которые тесно связаны.

Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, могут быть использованы в качестве зондов и праймеров для скрининга и идентификации других членов класса с использованием способов термоциклической или изотермической амплификации и гибридизации. Например, олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 2, могут быть использованы для определения присутствия или отсутствия химерного инсектицидного трансгена в образце дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученной из товарного продукта. Учитывая чувствительность определенных способов обнаружения нуклеиновых кислот, которые используют олигонуклеотиды, предполагается, что олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в любой из SEQ ID NO: 2, могут быть использованы для обнаружения соответствующего химерного инсектицидного белка в товарных продуктах, полученных из объединенных источников, где только часть товарного продукта получена из трансгенного растения, содержащего любую из SEQ ID NO: 2.

#### **Примеры**

Ввиду вышеизложенного специалистам в данной области техники будет понятно, что следующие раскрытые варианты реализации являются исключительно репрезентативными для настоящего изобретения, которые могут быть реализованы в различных формах. Таким образом, конкретные структурные и функциональные детали, раскрытые в данном документе, не должны интерпретироваться как ограничивающие.

Пример 1. Создание и клонирование последовательностей, кодирующих новые химерные инсектицидные белки, активные в отношении чешуекрылых.

Данный пример иллюстрирует создание новых химерных инсектицидных белков и клонирование, и экспрессию химерных инсектицидных белков.

Последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты были сконструированы из известных генов *Stu*-белка для получения полинуклеотидных последовательностей, кодирующих новые химерные инсектицидные белки. Полученные полинуклеотидные последовательности клонировали в плазмидный экспрессионный вектор *Bacillus thuringiensis* (Bt). После подтверждения полинуклеотидной последовательности экспрессионную плазмиду трансформировали в Bt и экспрессировали. Препараты новых химерных белков анализировали на активность против различных чешуекрылых-вредителей.

Многие полинуклеотидные последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, были получены и испытаны в биотесте. Не все химерные инсектицидные белки демонстрировали активность. Только несколько из химерных инсектицидных белков были отобраны на основании их активности в отношении конкретных чешуекрылых, продемонстрированной в биотесте. Варианты аминокислот, в которые были введены аминокислотные замены или альтернативные протоксиновые домены, также были получены на основе исходных химерных инсектицидных белков T1C867 и T1C868. Компоненты химерных инсектицидных белков (домены I, II и III и протоксин) согласно настоящему изобретению представлены в табл. 1. Также представлены аминокислотные замены в вариантах T1C868 относительно исходной последовательности белка T1C868.

Таблица 1. Новые химерные пестицидные белки и их компоненты

Токсин	ПРТ SEQ	Dom1	Dom2	Dom3	Протоксин	Аминокислотные модификации*
	ID NO:					
TIC1100	4	Cry1Ah	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC860	7	Cry1Bb1	Cry1Bb1	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC867	10	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ab3	
TIC867_20	13	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Da1	
TIC867_21	16	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry4	
TIC867_22	19	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry9	
TIC867_23	21	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Be	
TIC867_24	23	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ka	
TIC867_25	25	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ca	
TIC868	28	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	
TIC868_9	30	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	N240S_Y343Q_N3
						49T
TIC868_10	33	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Da1	
TIC868_11	36	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry4	
TIC868_12	39	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry9	
TIC868_13	41	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Be	
TIC868_14	43	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ka	
TIC868_15	45	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ca	
TIC868_29	47	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	Q136Y_Y343Q_N3 49T
TIC869	50	Cry1Ja1	Cry1Ja1	Cry1Jx	Cry1Ab3	
TIC836	53	Cry1Fa1	Cry1Fa1	Cry1Ab	Cry1Ac	

\*Аминокислотные мутации идентифицируются с использованием стандартного кода аминокислот ИЮПАК. См. Объединенная комиссия по биохимической номенклатуре ИЮПАК-IUB по биохимической номенклатуре. Номенклатура и система обозначений аминокислот и пептидов. Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984). Первое сокращение первой аминокислотной последовательности обозначает исходную аминокислоту в данном каркасном белке, число представляет положение аминокислоты, а второе сокращение аминокислотной последовательности обозначает аминокислоту, помещенную в данное положение в улучшенном варианте белка.

Пример 2. Новые химерные инсектицидные белки демонстрируют активность против чешуекрылых-вредителей.

Данный пример иллюстрирует тестирование химерных инсектицидных белков, описанных в примере 1, и активность в отношении чешуекрылых, наблюдаемую для химерных инсектицидных белков.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, экспрессировали в *Vt*.

Экспрессированные химерные инсектицидные белки затем анализировали против множества чешуекрылых, известных как вредители кукурузы, сахарного тростника, сои и хлопчатника, а также других культурных растений. В частности, инсектицидные белки анализировали на активность против совки бархатных бобов (*VBC*, *Anticarsia gemmatalis*), огневки сахарного тростника (*SCB*, *Diatraea saccharalis*), точильщика зернового кукурузного (*LSCB*, *Elasmopalpus lignosellus*), хлопковой совки (*CEW*, *Helicoverpa zea*), табачной листовертки (*TBW*, *Heliothis virescens*), соевой совки (*SBL*, *Chrysodeixis includens*), черной совки (*BLAW*, *Spodoptera cosmioides*), южной совки (*SAW*, *Spodoptera eridania*), кукурузной листовой совки (*FAW*, *Spodoptera frugiperda*), совки малой (*BAW*, *Spodoptera exigua*), совки американской (*OBW*, *Helicoverpa armigera*), азиатской хлопковой совки (*OLW*, *Spodoptera litura*), розового коробочного червя (*PBW*, *Pectinophora gossypiella*), совки-ипсилон (*BCW*, *Agrotis ipsilon*), огневки кукурузной юго-западной (*SWCB*, *Diatraea grandiosella*), шиповатого северного коробочного червя (*SBW*, *Earias vitella*), и мотылька стеблевого кукурузного (*ECB*, *Ostrinia nubilalis*). Американская кукурузная совка (*CEW*, *Helicoverpa zea*) также называется как коробочный червь (*SPW*) и совка хлопковая (*CBW*). Активность определяли при помощи комбинации показателей смертности и задержки роста, а также оценки МИК50 (минимальная ингибирующая концентрация для 50%). МИК50 относится к концентрации ингибирующей линьку, причем как мертвые личинки, так и личинки L1 (личинки, которые лишены линьки до вторых возрастов) учитываются в оценке. В табл. 2 показана активность каждого химерного инсектицидного белка. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя.

Таблица 2. Биологическая активность против выбранных чешуекрылых

Токсин	ПРТ SEQ ID NO:	Насекомое																
		VBC	SCB	LSCB	CEWSPWCBW	BLAW	TBW	SBL	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB	SBW
TIC1100	4	+	+			+			+		+		+	+				
TIC860	7	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+		+
TIC867	10	+	+			+		+		+	+	+	+			+		
TIC867_20	13																	
TIC867_21	16				+													
TIC867_22	19				+				+									
TIC868	28	+	+			+		+		+	+		+	+		+		+
TIC868_10	33								+									
TIC868_11	36								+									
TIC868_12	39								+									
TIC869	50	+	+					+		+						+		
TIC836	53	+				+		+	+	+								

Как можно видеть из табл. 2 выше, большинство химерных инсектицидных белков проявляли активность против одного или более видов чешуекрылых-вредителей.

Пример 3. Синтез генов, кодирующих химерные инсектицидные белки, для экспрессии в растениях.

Данный пример иллюстрирует синтез полинуклеотидов, кодирующих химерные инсектицидные белки, для экспрессии в растениях.

Синтетические кодирующие последовательности были сконструированы для применения в экспрессии химерных инсектицидных белков в растениях. Синтетические последовательности были сконструированы и синтезированы в соответствии со способами, как правило, описанными в патенте США 5500365, избегая некоторых неподходящих проблемных последовательностей, таких как последовательности полиаденилирования растений, обогащенные АТТТА и А/Т, при сохранении аминокислотной последовательности химерного инсектицидного белка. Нуклеотидные последовательности для этих генов, кодирующих химерные инсектицидные белки для экспрессии в растениях, перечислены в табл. 3.

Таблица 3. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, предназначенные для применения в растениях

Инсектицидный белок	ДНК SEQ ID NO:	ПРТ SEQ ID NO:
TIC1100	2	4
TIC1100	3	4
TIC860	6	7
TIC867	9	10
TIC867_20	12	13
TIC867_21	15	16
TIC867_22	18	19
TIC867_23	20	21
TIC867_24	22	23
TIC867_25	24	25
TIC868	27	28

TIC868_9	29	30
TIC868_10	32	33
TIC868_11	35	36
TIC868_12	38	39
TIC868_13	40	41
TIC868_14	42	43
TIC868_15	44	45
TIC868_29	46	47
TIC869	49	50
TIC836	52	53

Пример 4. Экспрессионные кассеты для экспрессии химерных инсектицидных белков в растениях.

Данный пример иллюстрирует конструкцию экспрессионных кассет, содержащих предназначенные для применения в растениях полинуклеотидные последовательности, которые кодируют химерные инсектицидные белки.

Разнообразные экспрессионные кассеты растений были сконструированы с применением полинуклеотидных последовательностей, кодирующих химерные инсектицидные белки, предложенные в табл. 3 и предназначенные для экспрессии в растениях. Такие экспрессионные кассеты полезны для транзientной экспрессии в протопластах растений или трансформации растительных клеток. Типичные экспрессионные кассеты были разработаны с учетом возможного размещения белка внутри клетки. Один набор экспрессионных кассет был сконструирован таким образом, чтобы белок был транслирован и хранился в цитозоле. Другой набор экспрессионных кассет был сконструирован так, чтобы содержать транзитный пептид, смежный с белком токсина, для обеспечения нацеливания на органеллы клетки, такие как хлоропласт или пластиду. Все экспрессионные кассеты были сконструированы, чтобы начаться на 5'-конце с промотора, который может состоять из нескольких промоторных элементов, энхансерных элементов или других экспрессионных элементов, известных специалистам в данной области техники, функционально связанных, для повышения экспрессии трансгена. За промоторной последовательностью, как правило, непрерывно следует одна или более лидерная последовательность на 3'-конце промотора. Интронная последовательность, как правило, расположена на 3'-конце лидерной последовательности, для улучшения экспрессии трансгена. Последовательность, кодирующая токсин или транзитный пептид, и последовательность, кодирующая токсин, как правило, расположена на 3'-конце функционально связанного промотора, лидера и интрона. Последовательность 3'-НТО, как правило, расположена, на 3'-конце кодирующей последовательности для облегчения терминации транскрипции и обеспечения последовательности, важной для полиаденилирования получаемого транскрипта. Все элементы, описанные выше, были функционально связаны между собой и расположены последовательно, часто с дополнительными последовательностями, используемыми для конструирования экспрессионной кассеты.

Пример 5. Активность в отношении чешуекрылых химерного инсектицидного белка в стабильно трансформированной кукурузе.

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

Сорт кукурузы LH244 трансформировали в бинарные векторы для трансформации, описанные в примере 4, с применением способа трансформации, опосредованной *Agrobacterium*.

Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биотестирование с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из не трансформированных растений сорта LH244, использовали в качестве отрицательного контроля. Множество объектов трансформации для каждого бинарного вектора оценивали против американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

Биотестирование с использованием листовых дисков выполняли на трансгенных растениях R<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> поколений. Кроме того, степень повреждения листьев оценивали для целых трансгенных F<sub>1</sub> растений, экспрессирующих определенные химерные инсектицидные белки, зараженных чешуекрылыми насекомыми-вредителями. F<sub>1</sub> трансгенные объекты, экспрессирующие TIC860 и TIC868, также оценивали по активности в поле против FAW, CEW, и SWCB. Результаты анализа приведены в табл. 4. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя. Как видно из табл. 4, большинство химерных инсектицидных белков и многие из вариантов химерных инсектицидных белков демонстрировали активность в отношении одного или более видов чешуекрылых-вредителей.

Таблица 4. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из стабильно трансформированной ткани листа кукурузы

Токсин	ПРТ SEQ ID NO:	Насекомое																	
		VBC	SCB	LSCB	CEWSPWCBW	BLAW	TBW	SBL	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB	SBW	
TIC1100	4	+	+			+			+		+		+	+					
TIC860	7	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+		+	
TIC867	10	+	+			+		+		+	+	+	+			+			
TIC867_20	13	HT	HT	HT		HT	HT	HT	HT		HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC867_21	16	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT		HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC867_22	19	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC868	28	+	+			+		+	+	+	+		+	+		+		+	
TIC868_10	33	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC868_11	36	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC868_12	39	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	+	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	
TIC869	50	+	+					+	+	+							+		
TIC836	53	+				+		+	+	+									

Пример 6. Активность в отношении чешуекрылых химерного инсектицидного белка в стабильно трансформированной сое.

Данный пример иллюстрирует ингибиторную активность, проявляемую химерным инсектицидным белком в отношении чешуекрылых-вредителей, экспрессированным растениями сои и предложенным в виде корма для соответствующих насекомых-вредителей.

Кодирующие последовательности для выбранного химерного инсектицидного белка изменяли для экспрессии в растениях, клонировали в бинарный вектор для трансформации растений, и применяли для трансформации клеток растения сои. Векторы для трансформации растений содержали первую трансгенную кассету для экспрессии химерного инсектицидного белка, как описано в примере 4 и вторую трансгенную кассету для селекции трансформированных растительных клеток, с применением спектиномициновой селекции. В некоторых случаях, например в случае TIC1100, TIC860 и TIC836, последовательность, кодирующая хлоропластный транзитный пептид, была функционально связана с последовательностью, кодирующей химерный инсектицидный белок. Анализы выполняли с использованием TIC1100, TIC860 и TIC836, нацеленными и ненацеленными на пластиду. В табл. 5 ниже показан химерный инсектицидный белок и вариант TIC867 химерного инсектицидного белка и связанные кодирующие последовательности, применяемые для экспрессии в стабильно трансформированной сое.

Клетки растения сои трансформировали в бинарные векторы для трансформации, описанные выше, с применением способа трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. В результате трансформированные растительные клетки индуцировали для формирования растений сои. Ткани листьев собирали и использовали в биотестировании, как описано в примере 5, или альтернативно, лиофилизированные ткани использовали в виде корма насекомых для биотестирования. Биотестирование выполняли против FAW, южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), коробочного червя (SPW, *Helicoverpa zea*), совки бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*), черной совки (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), точильщика зернового кукурузного (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) и совки американской (OBW, *Helicoverpa armigera*).

В табл. 5 показана активность в отношении отдельных видов чешуекрылых для каждого инсектицидного белка в растениях поколения R<sub>0</sub>, причем "+" указывает на активность. Как видно из табл. 5, каждый из химерных инсектицидных белков, экспрессируемых в стабильно трансформированной сое, демонстрировал активность против нескольких видов чешуекрылых. Стоит отдельно отметить, что вариант TIC867, TIC867\_23 продемонстрировал активность в отношении SPW.



Таблица 5. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из ткани листа стабильно трансформированной R<sub>0</sub> сои

Инсектицидный белок	FAW	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	LSCB	OBW
TIC1100	+	+	+		+		+	+	+
TIC860	+	+	+		+			+	
TIC867	+	+	+		+	+		+	
TIC867_20		+	+						
TIC867_21		+	+						
TIC867_22		+	+						
TIC867_23	+	+	+	+					
TIC867_24		+	+						
TIC867_25		+	+						
TIC868	+		+		+		+	+	
TIC869			+		+	+		+	
TIC836	+	+	+		+	+	+		+

Выбранным трансформированным объектам обеспечили самоопыление и полученное зерно выращивали. Ткани листа собирали с растений поколения R<sub>1</sub> и использовали в кормовом биотесте. R<sub>1</sub> растения, экспрессирующие TIC1100, TIC860, TIC867, TIC868, TIC869 и TIC836, исследовали на активность против SAW, SBL, SPW и VBC. В табл. 6 показана наблюдаемая в этих тестах активность. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя. Как показано в табл. 6, наиболее экспрессируемый химерный инсектицидный белок из растений R<sub>1</sub> поколения проявил активность в отношении одного или более видов чешуекрылых.

Таблица 6. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из ткани листа стабильно трансформированной R<sub>1</sub> сои

Токсин	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC1100	+	+		+
TIC860	+	+		+
TIC867	+			
TIC868	+	+		+
TIC869	+	+		+
TIC836	+	+		+

В табл. 7 представлены результаты полевых испытаний, проведенных в теплице с использованием стабильно трансформированных растений сои поколения R<sub>1</sub>, экспрессирующих TIC1100, TIC860, и TIC836. Виды, используемые для заражения растений в теплице, включают SAW, SBL и SPW. Резистентность определяли как дефолиацию в растениях сои, которая составляет менее чем или равную пятнадцати процентов. Резистентность, наблюдаемая в экспериментальной клетке, соответствует резистентности, наблюдаемой у ткани листьев R<sub>1</sub> поколения растений сои, анализа, представленного в табл. 6. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя.

Таблица 7. Профиль активности TIC1100, TIC860 и TIC836, экспрессированных в сое поколения R<sub>1</sub>, исследуемый в полевых испытаниях в теплице

Токсин	SAW	SBL	SPW
TIC1100	+	+	
TIC860	+	+	
TIC836	+	+	

Полевые испытания в теплицах с использованием стабильно трансформированных растений сои поколения R<sub>1</sub>, экспрессирующих TIC867 и TIC869, также проводили в двух разных местах в Аргентине, в Асеведо и Фонтесуэле. Виды, используемые для заражения растений в теплицах, включают южноамериканскую совку (SABW, *Helicoverpa gelotopon*), VBC, BLAW, и пяденицу подсолнечниковую (SFL, *Rachiplusia nu*). Резистентность определяли как дефолиацию в растениях сои, которая составляет менее чем или равная пятнадцати процентов. В табл. 8 ниже показана наблюдаемая резистентность. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя. Как показано в табл. 8, трансгенные растения сои, экспрессирующие TIC867, продемонстрировали резистентность к BLAW и VBC. Трансгенные растения сои, экспрессирующие TIC869, продемонстрировали резистентность к SABW,

SFL, BLAW, и VBC.

Таблица 8. Профиль активности TIC867 и TIC869, экспрессируемых в сое поколения R<sub>1</sub>, тестировали в полевых испытаниях в теплице

Токсин	Асеведо			Фонтесуэла		
	SABW	SFL	VBC	SABW	BLAW	VBC
TIC867			+		+	+
TIC869		+	+	+	+	+

Пример 7. Активность в отношении чешуекрылых химерного инсектицидного белка в стабильно трансформированном хлопчатнике.

В данном примере показана ингибиторная активность, проявляемая химерным инсектицидным белком против чешуекрылых насекомых-вредителей, при экспрессии в растениях хлопчатника, и предложены в качестве диеты для соответствующих насекомых-вредителей.

Кодирующие последовательности для выбранного химерного инсектицидного белка, измененные для экспрессии в растениях, клонировали в бинарный вектор для трансформации растений, и применяли для трансформации растительных клеток хлопчатника. Полученные бинарные векторы были похожи на те, что описаны в примере 4, и их использовали, чтобы экспрессировать TIC860, нацеленные и ненацеленные на пластиды, (кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 6; последовательность белка: SEQ ID NO: 7), TIC867 (кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 9; последовательность белка: SEQ ID NO: 10), TIC868 (кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 27; последовательность белка: SEQ ID NO: 28) и TIC867\_23 (кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 20; последовательность белка: SEQ ID NO: 23).

Растительные клетки хлопчатника трансформировали при помощи способа трансформации, опосредованного *Agrobacterium*. Трансформированные клетки хлопчатника индуцировали для образования целых растений. Ткань листьев хлопчатника использовали в биотестировании, как описано в примере 5, против совки хлопковой (CBW, *Helicoverpa zea*), FAW, TBW и SBL. В табл. 9 показана активность, наблюдаемая в отношении данных видов чешуекрылых для TIC860, TIC867, и TIC868 в стабильно трансформированном хлопчатнике поколения R<sub>0</sub>, причем "+" указывает на активность. Как видно из табл. 9, TIC860, TIC867, и TIC868 продемонстрировали активность в отношении двух или более видов чешуекрылых насекомых-вредителей в стабильно трансформированном хлопчатнике поколения R<sub>0</sub>.

Таблица 9. Биотестирование активности TIC860, TIC867 и TIC868 из листовой ткани стабильно трансформированного хлопчатника поколения R<sub>0</sub>

Токсин	CBW	FAW	TBW	SBL
TIC860		+		+
TIC867	+	+	+	HT
TIC868		+		+

Выбранные трансформированные объекты использовали для того чтобы получить R<sub>1</sub> семена. R<sub>1</sub> растения, экспрессирующие TIC860, TIC867, и TIC868, исследовали на резистентность к CBW, FAW, TBW и SBL. Ткани листа, бутона и коробочки использовали в анализе. В табл. 10 показана наблюдаемая в этих тестах активность. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя. Как показано в табл. 10, TIC860 продемонстрировал активность против FAW в ткани листьев. Кроме того, химерный инсектицидный белок TIC867 продемонстрировал активность против CBW и FAW в ткани листа, бутона и коробочки, а также TBW и SBL в листе. Химерный инсектицидный белок TIC868 продемонстрировал активность против FAW в тканях листа, бутона и коробочки, а также TBW и SBL в листе.

Таблица 10. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из ткани листа стабильно трансформированного R<sub>1</sub> хлопчатника

Токсин	CBW			FAW			TBW	SBL
	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	Лист
TIC860				+				
TIC867	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC868				+	+	+	+	+

Пример 8. Клонирование последовательностей, кодирующих новые химерные инсектицидные белки, активные в отношении чешуекрылых.

Последовательности рекомбинантных нуклеиновых кислот были сконструированы из известных генов Сгу-белка для получения кодирующих последовательностей, кодирующих новые химерные инсектицидные белки. Полученные кодирующие последовательности клонировали в плазмидный экспрессионный вектор *Bacillus thuringiensis* (Bt). После подтверждения клонированной последовательности экс-

прессионную плазмиду трансформировали в Vt и экспрессировали. Препараты новых химерных Сгу-белков исследовали активность против различных чешуекрылых вредителей. Многие кодирующие последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, были получены и испытаны в биоанализе. Не все химерные инсектицидные белки демонстрировали активность. Только несколько из химерных инсектицидных белков были отобраны на основании их активности в отношении конкретных чешуекрылых и представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11. Новые химерные пестицидные белки и их соответствующие бактериальные кодирующие последовательности и последовательности белка

Пестицидный белок	Бактериальная ДНК SEQ ID NO:	Белковая SEQ ID NO:
TIC713	54	55
TIC843	56	57
TIC862	58	59
TIC1099	60	61
TIC1103	78	79
TIC1101	80	81
TIC845	82	83
TIC846	84	85
TIC858	86	87
TIC865	88	89
TIC866	90	91
TIC838	92	93
TIC839	94	95
TIC841	96	97
TIC842	98	99
TIC850	100	101
TIC859	102	103
TIC861	104	105
TIC848	106	107
TIC849	108	109
TIC847	110	111

Пример 9. Новые химерные инсектицидные белки демонстрируют активность против чешуекрылых вредителей.

Кодирующие последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, экспрессировали в Vt. Затем экспрессированные белки анализировали в отношении различных *Lepidoptera*, известных как вредители кукурузы, сахарного тростника, сои и хлопчатника, а также других культурных растений. Инсектицидные белки анализировали на активность против совки бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), огневки сахарного тростника (SCB, *Diatraea saccharalis*), точильщика зернового кукурузного (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), коробочного червя (CEW, *Helicoverpa zea*), табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), черной совки (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совки малой (BAW, *Spodoptera exigua*), совки американской (OBW, *Helicoverpa armigera*), азиатской хлопковой совки (OLW, *Spodoptera litura*), розового коробочного червя (PBW, *Pectinophora gossypiella*), совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*) и мотылька стеблевого кукурузного (ECB, *Ostrinia nubilalis*). Американская кукурузная совка (CEW, *Helicoverpa zea*) также называется как коробочный червь (SPW) и совка хлопковая (CBW). Активность определяли при помощи комбинации показателей смертности и задержки роста, а также оценки МИК50. МИК50 относится к концентрации ингибирующей линьку, причем как мертвые личинки, так и личинки L1 (личинки, которые лишены линьки до вторых возрастов), учитываются в оценке. В табл. 12 ниже показана активность каждого химерного инсектицидного белка. Знак "+" указывает на активность, наблюдаемую у конкретного насекомого-вредителя.

Таблица 12. Биологическая активность против выбранных Lepidoptera

PPT SEQ ID NO:	Насекомое															
	VBC	SCB	LSCB	CEW SPW CBW	TBW	SBL	BLAW	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB
55	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+
57	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+		+	
59	+	+	+	+	+	+		+	+						+	
61	+	+		+		+	+		+	+	+	+	+		+	+
79	+	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+
81	+	+				+	+									
83	+	+				+		+		+			+		+	
85	+	+				+		+				+				
87	+	+				+		+		+		+	+		+	
89	+	+	+		+	+	+	+	+						+	
91	+	+				+			+			+			+	
93	+	+	+		+	+										
95	+	+				+	+	+							+	
97	+	+				+	+						+		+	
99	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
101	+					+	+	+	+	+		+		+	+	
103	+	+			+	+	+	+	+	+		+		+	+	
105	+	+				+		+							+	
107	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+			
109	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+			
111	+	+			+	+		+	+			+	+		+	

Как можно видеть из табл. 12 выше, все химерные инсектицидные белки проявляют активность против нескольких видов чешуекрылых насекомых.

Пример 10. Варианты аминокислот TIC1099 демонстрируют активность в отношении чешуекрылых.

Кодирующую последовательность для TIC1099 (SEQ ID NO: 60) модифицировали известными в данной области техники способами для изменения конкретных аминокислот из исходной белковой последовательности TIC1099 (SEQ ID NO: 61). Полученные варианты исследовали на активность против выбранных Lepidoptera. В табл. 13 ниже показаны варианты TIC1099 и соответствующие ДНК и белковые SEQ ID NO.

Таблица 13. Варианты TIC1099

Вариант TIC1099	ДНК SEQ ID NO:	ПРТ SEQ ID NO:
TIC1099-T507E	62	63
TIC1099-R522K	64	65
TIC1099-K490S	66	67
TIC1099-T562R	68	69
TIC1099-S553R	70	71
TIC1099-G498D	72	73
TIC1099-K490A	74	75
TIC1099-E564A	76	77

Для каждого варианта исследовали смертность и замедление роста кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), американской кукурузной совки (CEW, *Helicoverpa zea*), совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*). В табл. 14 ниже показана активность в отношении каждого чешуекрылого вредителя. Активность оценивали от "+" до "++++" в зависимости от процента смертности.

Таблица 14. Активность вариантов TIC1099 в отношении Lepidoptera

Вариант TIC1099	ПРТ SEQ ID NO:	FAW	CEW	BCW	SBL	SWCB
TIC1099	61	+++ +	+++	+++ +	+++ +	+++
TIC1099-T507E	63	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
TIC1099-R522K	65	+++ +	+++ +	+++ +	+++	+++ +
TIC1099-K490S	67	+++ +	+++	+++ +	+ +	+
TIC1099-T562R	69	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
TIC1099-S553R	71	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
TIC1099-G498D	73	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
TIC1099-K490A	75	+++ +	+++ +	+++ +	+++	+++
TIC1099-E564A	77	+++	+ +	+++	+	+

Все варианты TIC1099 продемонстрировали активность против пяти тестируемых видов Lepidoptera. Несколько вариантов продемонстрировали более низкую активность по сравнению с другими для конкретных вредителей.

Пример 11. Химерные инсектицидные белки, экспрессированные в стабильно трансформированной кукурузе, демонстрируют активность в отношении чешуекрылых-вредителей.

Синтетические кодирующие последовательности конструировали для экспрессии кодируемого белка в растениях, клонировали в бинарный растительный вектор для трансформации, и использовали для трансформации клеток растения кукурузы. Векторы для трансформации растений содержат первую трансгенную кассету для экспрессии химерного инсектицидного белка, который содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидером, функционально связанным 5' с интроном, функционально связанным 5' с последовательностью, кодирующей химерный инсектицидный белок, которая в свою очередь функционально связана 5' с 3'-НТО и; вторую трансгенную кассету для селекции трансформированных клеток растений с применением глифосатной селекции. Ниже в табл. 15 показаны последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, применяемые для экспрессии в кукурузе и соответствующие SEQ ID NO.

Таблица 15. Последовательности, кодирующие инсектицидные белки, и соответствующие SEQ ID NO

Инсектицидный белок	ДНК SEQ ID NO:	ПРТ SEQ ID NO:
TIC713	112	55
TIC713	113	55
TIC843	114	57
TIC862	115	59
TIC1099	116	61
TIC1103	117	79
TIC845	118	83
TIC846	119	85
TIC858	120	87
TIC866	121	91
TIC838	122	93
TIC841	123	97
TIC842	124	99
TIC850	125	101
TIC859	126	103
TIC861	127	105
TIC848	128	107
TIC849	129	109
TIC847	130	111

Сорт кукурузы LH244 трансформировали с помощью бинарных векторов для трансформации, описанных выше, с применением способа трансформации, опосредованной Agrobacterium. Трансформированные клетки индуцировали для образования растений при помощи способов, известных в данной области техники. Биотестирование с использованием листовых дисков растения выполняли по аналогии с

теми, которые описаны в патенте США № 8344207. Ткань, полученную из нетрансформированных растений сорта LH244, использовали в качестве отрицательного контроля. Множество объектов трансформации для каждого бинарного вектора оценивали против американской кукурузной совки (CEW, *Helioverpa zea*), кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*). Результаты анализа показаны в табл. 16, где "+" обозначает активность.

Таблица 16. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из стабильно трансформированной ткани листа кукурузы

Инсектицидный белок	CEW	FAW	BCW	SWCB
TIC713	+	+		+
TIC843	+	+		+
TIC862	+	+		+
TIC1099	+	+	+	+
TIC1103	+	+		+
TIC845	+	+		+
TIC846	+	+		+
TIC858	+	+		+
TIC866	+	+		+
TIC838		+		+
TIC841	+	+		+
TIC842	+	+	+	+
TIC850	+	+		+
TIC859	+	+		+
TIC861	+	+		+
TIC848	+	+		+
TIC849	+	+		+
TIC847		+		+

Как можно видеть в табл. 16 выше, все химерные инсектицидные белки продемонстрировали активность против двух или более видов чешуекрылых-насекомых.

Пример 12. Химерные инсектицидные белки, экспрессированные в стабильно трансформированной сое, демонстрируют активность в отношении чешуекрылых-вредителей.

Кодирующие последовательности для выбранного химерного инсектицидного белка изменяли для экспрессии в растениях, клонировали в бинарный вектор для трансформации растений, и применяли для трансформации клеток растения сои. Векторы для трансформации растений содержат первую трансгенную кассету для экспрессии химерного инсектицидного белка, который содержит конститутивный промотор, функционально связанный 5' с лидером, функционально связанным 5' с кодирующей последовательностью химерного инсектицидного белка, которая, в свою очередь, функционально связана 5' с 3'-НТО и; вторую трансгенную кассету для селекции трансформированных растительных клеток с использованием спектиномициновой селекции. В табл. 17 ниже показаны последовательности, кодирующие химерные инсектицидные белки, применяемые для экспрессии в сое, и соответствующие SEQ ID NO.

Таблица 17. Последовательности, кодирующие инсектицидные белки, и соответствующие SEQ ID NO

Инсектицидный белок	ДНК SEQ ID NO:	ПРТ SEQ ID NO:
TIC1103	117	79
TIC866	121	91
TIC842	124	99
TIC849	129	109

Клетки растения сои трансформировали с помощью бинарных векторов для трансформации, описанных выше, с применением способа трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. В результате трансформированные растительные клетки индуцировали для формирования растений сои. Ткани листьев собирали и использовали в биотестировании, как описано в примере 11, или альтернативно, лиофили-

зированные ткани использовали в виде корма насекомых для биотестирования. Биотестирование выполняли против кукурузной листовой совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), коробочного червя (SPW, *Helicoverpa zea*), совки бархатных бобов (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*), черной совки (BLAW, *Spodoptera cosmioidea*), южной совки (SAW, *Spodoptera eridania*), точильщика зернового кукурузного (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) и совки американской (OBW, *Helicoverpa armigera*). Ниже в табл. 18 показана активность в отношении выбранных видов *Lepidoptera* для каждого инсектицидного белка в растениях поколения  $R_0$ .

Таблица 18. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из ткани листа стабильно трансформированной  $R_0$  сои

Инсектицидный белок	FAW	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	SAW	LSCB	OBW
TIC1103		+	+	+	+	+			+	+
TIC866	+		+		+				+	+
TIC842	+	+	+		+	+	+	+	+	+
TIC849		+	+	+	+	+			+	

Как видно из табл. 18, каждый из химерных инсектицидных белков, экспрессированный в стабильно трансформированной сое, демонстрировал активность против нескольких видов чешуекрылых.

Выбранным трансформированным объектам обеспечили самоопыление и полученное зерно выращивали. Ткани листа собирали с растений поколения  $R_1$  и использовали в биотестировании корма. В табл. 19 показана активность инсектицидных белков, экспрессированных в ткани листьев соевого листа  $R_1$ , наблюдаемая в отношении некоторых видов чешуекрылых.

Таблица 19. Биотестирование активности химерного инсектицидного белка из ткани листа стабильно трансформированной  $R_1$  сои

Токсин	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC1103		+	+	+
TIC866	+	+		+
TIC842		+	+	
TIC849		+	+	

Как можно видеть из вышеприведенной табл. 19, экспрессированные химерные инсектицидные белки из растений поколения  $R_1$  продемонстрировали активность в отношении двух или более видов чешуекрылых.

Все композиции, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть сделаны и выполнены без излишнего экспериментирования в свете настоящего раскрытия. Хотя композиции настоящего изобретения были описаны с точки зрения вышеизложенных иллюстративных вариантов реализации, специалистам в данной области техники будет понятно, что варианты, изменения, модификации и переделки могут быть применены к композиции, описанной в данном документе, без отступления от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые схожи и химически, и физиологически, могут быть использованы вместо агентов, описанных в данном документе, достигая тех же самых или подобных результатов. Все таковые аналогичные замены и модификации, очевидные специалистам в данной области техники, считаются не выходящими за пределы сущности, объема и концепции настоящего изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в настоящей спецификации, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный инсектицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 4, где химерный инсектицидный белок проявляет ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда *Lepidoptera*.

2. Химерный инсектицидный белок по п.1, отличающийся тем, что вид насекомого выбран из группы, состоящей из *Anticarsia gemmatalis*, *Diatraea saccharalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera cosmioidea*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Pectinophora gossypiella*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitella*, *Heliothis virescens*.

coverpa gelotopeon и Rachiplusia nu.

3. Полинуклеотид, кодирующий химерный инсектицидный белок по п.1.

4. Полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что функционально связан с гетерологичным промотором.

5. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.3, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки-хозяина и растительной клетки-хозяина.

6. Клетка-хозяин по п.5, отличающаяся тем, что бактериальная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* и *Erwinia*.

7. Клетка-хозяин по п.5, отличающаяся тем, что растительная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки однодольных растений и клетки двудольных растений.

8. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, содержащая химерный инсектицидный белок по п.1.

9. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.8, дополнительно содержащая по меньшей мере один агент, обладающий ингибирующей активностью в отношении насекомых, отличный от химерного инсектицидного белка, выбранный из группы, состоящей из белка, обладающего ингибирующей активностью в отношении насекомых, и молекулы дцРНК, обладающей ингибирующей активностью в отношении насекомых.

10. Композиция, обладающая ингибирующей активностью в отношении насекомых, по п.9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один другой инсектицидный агент проявляет активность в отношении одного или более видов вредителей отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Homoptera* или *Thysanoptera*.

11. Семя, проявляющее ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда *Lepidoptera*, содержащее:

a. химерный инсектицидный белок по п.1; или

b. полинуклеотид, кодирующий химерный инсектицидный белок по п.1.

12. Способ борьбы с чешуекрылым-вредителем, включающий приведение в контакт чешуекрылого-вредителя с ингибирующим количеством химерного инсектицидного белка по п.1.

13. Трансгенное растение, клетка растения или часть растения, содержащие химерный инсектицидный белок по п.1, причем трансгенное растение, клетка растения или часть растения проявляет ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда *Lepidoptera*.

14. Способ борьбы с чешуекрылым-вредителем, включающий воздействие трансгенным растением, клеткой растения или частью растения по п.13 на вредителя, причем указанное растение, клетка растения или часть растения экспрессирует ингибирующее в отношении чешуекрылых количество химерного инсектицидного белка.

15. Способ получения семени, проявляющего ингибирующую активность в отношении видов насекомых отряда *Lepidoptera*, включающий:

a. посадку трансгенного растения по п.13; и

b. сбор потомственного семени от указанного трансгенного растения, причем собранное потомственное семя содержит химерный инсектицидный белок по п.1.

16. Обработанный растительный продукт, содержащий полинуклеотид, кодирующий химерный инсектицидный белок по п.1, далее определенный как выбранный из группы, состоящей из растительной биомассы, масла, муки грубого помола, корма для животных, муки, хлопьев, отрубей, волокна, шелухи и обработанного семени.

17. Химерный инсектицидный белок по п.1, отличающийся тем, что содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4.

18. Обработанный растительный продукт по п.16, содержащий химерный инсектицидный белок по п.1.

