

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040502**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.10

(51) Int. Cl. *A01P 7/04* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892293

(22) Дата подачи заявки
2017.05.02

(54) ИНСЕКТИЦИДНЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/331,708

(32) 2016.05.04

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/030602

(87) WO 2017/192560 2017.11.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЭД
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК.; Е. И.
ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Бэрри Дженнифер Кара, Бартоломэй
Кристиан, Д'Лима Луиза, Инглиш
Джеймс Дж., Хейз Кевин Роберт, Лю
Лу, Лам Эми, Поланд Брэд, Шеперс
Эрик Джуд, Се Вэйпин (US), Ялпани
Нассер (CA), Чжу Гэньхай (US)**

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

(56) US-A1-20140007292
US-A1-20110023184
US-A1-20140274885
US-A1-20140046049
UniProtKB/TrEMBL Accession No.
A5CTM8, 9 December 2015 [online]. [Retrieved on 18 September 2017]. Retrieved from the internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A5CTM8.txt?version=40>> Entire document
UniProtKB/TrEMBL Accession No. A8GEE9,
9 December 2015 [online]. [Retrieved on 18 September 2017]. Retrieved from the internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A8GEE9.txt?version=36>> Entire document
UniProtKB/TrEMBL Accession No.
A0A0F4QUD9 9 December 2015 [online] [Retrieved on 18 September 2017] Retrieved from the internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A0F4QUD9.txt?version=4>> Entire document

(57) Предусмотрены композиции и способы контроля вредителей. Способы предусматривают трансформацию организмов последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей инсектицидный белок. В частности, последовательности нуклеиновой кислоты применимы для получения растений и микроорганизмов, которые обладают инсектицидной активностью. Таким образом, предусмотрены трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, растительные ткани и семена. Композиции представляют собой инсектицидные нуклеиновые кислоты и белки из видов бактерий. Последовательности находят применение при конструировании векторов экспрессии для последующей трансформации организмов, представляющих интерес, в том числе растений, в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов. Пестицидные белки находят применение в контроле, подавлении роста или уничтожении популяций вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, грибов, полужесткокрылых и нематод и в получении композиций с инсектицидной активностью.

040502
B1

040502
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/331708, поданной 4 мая 2016 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на перечень последовательностей, предоставленный в электронном виде

Официальная копия данного перечня последовательностей предоставлена в электронном виде с помощью EFS-Web как перечень последовательностей в файле формата ASCII с названием "6441WOPCT_Sequence_Listing", созданном 1 мая 2017 года и имеющем размер 1094 килобайта, и подана одновременно с описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии. Предусмотрены новые гены, которые кодируют пестицидные белки. Эти пестицидные белки и последовательности нуклеиновой кислоты, которые их кодируют, применимы в получении пестицидных составов и в получении трансгенных растений, устойчивых к вредителям.

Предпосылки изобретения

Биологический контроль насекомых-вредителей, имеющих значение для сельского хозяйства, с применением микробного средства, такого как грибы, бактерии или другие виды насекомых, представляет не оказывающую отрицательного влияния на окружающую среду и коммерчески привлекательную альтернативу синтетическим химическим пестицидам. В целом можно сказать, что применение биопестицидов создает меньший риск загрязнения и неблагоприятных воздействий на окружающую среду, и биопестициды обеспечивают специфичность в отношении большего числа мишеней, чем та, которая характерна для традиционных химических инсектицидов широкого спектра действия. Кроме того, зачастую производство биопестицидов стоит дешевле, и вследствие этого улучшается экономически эффективный выход продукции для широкого спектра сельскохозяйственных культур.

Как известно, определенные виды микроорганизмов рода *Bacillus* обладают пестицидной активностью в отношении ряда насекомых-вредителей, в том числе *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* и других. *Bacillus thuringiensis* (Bt) и *Bacillus popilliae* входят в число наиболее успешных средств биологического контроля, разработанных на данное время. Патогенность в отношении насекомых также приписывалась штаммам *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* и *B. cereus*. Микробные инсектициды, в частности, полученные из штаммов *Bacillus*, сыграли важную роль в сельском хозяйстве как альтернатива химическому контролю вредителей.

Были разработаны культурные растения с повышенной устойчивостью к насекомым с помощью генной инженерии культурных растений для выработки пестицидных белков *Bacillus*. Например, с помощью генной инженерии были созданы растения кукурузы и хлопчатника для продуцирования пестицидных белков, выделенных из штаммов *Bacillus thuringiensis*. Данные сельскохозяйственные культуры, разработанные с помощью генной инженерии, в настоящее время широко применяются в сельском хозяйстве и предоставляют фермеру не оказывающую отрицательного влияния на окружающую среду альтернативу традиционным способам контроля насекомых. Хотя они и были признаны коммерчески весьма успешными, данные разработанные с помощью генной инженерии устойчивые к насекомым культурные растения обеспечивают устойчивость только к узкому спектру экономически важных насекомых-вредителей. В некоторых случаях насекомые могут развивать устойчивость к различным инсектицидным соединениям, что повышает необходимость в идентификации альтернативных биологических средств контроля для контроля вредителей.

Соответственно, остается необходимость в новых пестицидных белках с различными спектрами инсектицидной активности в отношении насекомых-вредителей, например в инсектицидных белках, которые активны в отношении ряда насекомых из отряда *Lepidoptera* и отряда *Coleoptera*, в том числе без ограничения насекомых-вредителей, у которых развилась устойчивость к существующим инсектицидам.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте предусмотрены композиции и способы обеспечения пестицидной активности у бактерий, растений, растительных клеток, тканей и семян. Композиции включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности пестицидных и инсектицидных полипептидов, векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки-хозяева, содержащие векторы. Композиции также включают последовательности пестицидных полипептидов и антитела к таким полипептидам. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена.

В другом аспекте предусмотрены выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды IPD090, в том числе аминокислотные замены, делеции, вставки, и их фрагменты. Предусматриваются выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, способные кодировать полипептиды IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384, а также аминокислотные замены, делеции, вставки, их фрагменты и их комбинации.

ции. Также охватываются последовательности нуклеиновой кислоты, которые комплементарны последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления или которые гибридизуются с последовательностью согласно вариантам осуществления. Последовательности нуклеиновой кислоты можно применять в ДНК-конструкциях или кассетах экспрессии для трансформации и экспрессии в организмах, в том числе микроорганизмах и растениях. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, которые были сконструированы для экспрессии в организме, в том числе без ограничения микроорганизме или растении.

В другом аспекте охвачены полипептиды IPD090. Также предусматриваются выделенные или рекомбинантные полипептиды IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 и SEQ ID NO: 384, а также аминокислотные замены, делеции, вставки, их фрагменты и их комбинации.

В другом аспекте предусмотрены способы получения полипептидов и применения этих полипептидов для контроля или уничтожения вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, нематод, грибов и/или двукрылых. Трансгенные растения согласно вариантам осуществления экспрессируют одну или несколько пестицидных последовательностей, раскрытых в данном документе. В различных вариантах осуществления трансгенное растение дополнительно содержит один или несколько дополнительных генов устойчивости к насекомым, например один или несколько дополнительных генов для контроля вредителей из группы жесткокрылых, чешуекрылых, полужесткокрылых или нематод. Специалисту в данной области будет понятно, что трансгенное растение может содержать какой-либо ген, обеспечивающий агрономический признак, представляющий интерес.

В другом аспекте также предусмотрены способы выявления нуклеиновых кислот и полипептидов согласно вариантам осуществления в образце. Предусмотрен набор для выявления присутствия полипептида IPD090 или выявления присутствия полинуклеотида, кодирующего полипептид IPD090, в образце. Набор может предусматриваться вместе со всеми реагентами и контрольными образцами, необходимыми для осуществления способа выявления предполагаемого средства, а также с инструкциями по применению.

В другом аспекте композиции и способы согласно вариантам осуществления применимы для получения организмов с улучшенной устойчивостью к вредителям или переносимостью вредителей. Эти организмы и композиции, содержащие организмы, желательны для сельскохозяйственных целей. Композиции согласно вариантам осуществления также применимы для получения измененных или улучшенных белков, которые обладают пестицидной активностью, или для выявления наличия полипептидов IPD090.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1B показано выравнивание с помощью модуля ALIGNX® пакета программ Vector NTI® аминокислотных последовательностей полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) и полипептида IPD090Ca (SEQ ID NO: 6). Выделено отличие аминокислотных последовательностей между аминокислотными последовательностями. Отличающиеся консервативные аминокислоты обозначены штриховкой (A), а отличающиеся неконсервативные аминокислоты - штриховкой (A). N-концевые аминокислоты, удаленные по сравнению с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в усеченном варианте, полипептиде IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10) из примера 6, подчеркнуты в последовательности IPD090Aa (SEQ ID NO: 2). Соответствующие граничные точки химерных белков IPD090Aa/IPD090Ca из примера 11 указаны ниже последовательности IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) посредством "▲", выше последовательности IPD090Ca (SEQ ID NO: 6) - посредством "▼".

На фиг. 2 показана гистограмма, отображающая значения измерения оптической плотности флуоресценции в геле, в геле SDS-PAGE из примера 14, в отношении гомологичного конкурирования связывания 6,3 нМ IPD090Aa^{Alexa} с BBMV WCRW, нормализованного по отношению к сигналу связывания в отсутствие немеченого белка ("6 нМ Alexa-IPD090") и в присутствии насыщающей концентрации немеченого белка ("13 мкМ IPD090"). Отличие в величине между столбцами отображает специфическое связывание.

На фиг. 3 показан показатель поражения узлов кукурузным жуком (CRWNIS) на отдельных трансгенных объектах маиса T0 из конструкций PHP73234 и PHP73237, экспрессирующих полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 377, и PHP77372, экспрессирующей полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 10.

На фиг. 4 показана структура IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), определенная посредством рентгеноструктурной кристаллографии, указывающая домен MACPF N-концевого участка и β-призматический домен участка C-концевого домена. Атом Mg⁺ показан в виде сферы в нижней части β-призматического домена. Два кластера спиралей помечены как CH1 и CH2.

На фиг. 5 показан поворот на 90° полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) вокруг вертикальной оси, показывающий N-концевую β-нить для 5-го члена центрального β-слоя.

На фиг. 6 показан вид крупным планом C-концевого β-призматического домена структуры IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), иллюстрирующей 3-х мерную ось и взаимодействия Mg⁺2.

На фиг. 7 показана карта Рамачандрана для улучшенной структуры IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) 2,1 Å.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными методами, протоколами, клеточными линиями, родами и реагентами, в связи с этим они могут варьировать.

Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевает как ограничивающая объем настоящего изобретения.

Используемая в данном документе форма единственного числа включает ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает множество таких клеток, и ссылка на "белок" включает ссылку на один или несколько белков или их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и т.д. Все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение, если явно не указано иное.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для контроля вредителей. Способы предусматривают трансформацию организмов последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептиды IPD090. В частности, последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления применимы для получения растений и микроорганизмов, которые обладают пестицидной активностью. Таким образом, предусмотрены трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, растительные ткани и семена. Композиции включают пестицидные нуклеиновые кислоты и белки из видов бактерий. Последовательности нуклеиновой кислоты находят применение в конструировании векторов экспрессии для последующей трансформации организмов, представляющих интерес, в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов и для создания измененных полипептидов IPD090 с помощью способов, известных в данной области, таких как сайт-направленный мутагенез, замена доменов или ДНК-шаффлинг. Полипептиды IPD090 находят применение в контроле или уничтожении популяций вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, грибов, полужесткокрылых и нематод и в получении композиций с пестицидной активностью. Насекомые-вредители, представляющие интерес, включают без ограничения виды *Lepidoptera*, в том числе без ограничения совку кукурузную (*CEW*) (*Helicoverpa zea*), огневку кукурузную (*ECB*) (*Ostrinia nubilalis*), моль капустную, например *Helicoverpa zea* Boddie; совку соевую, например *Pseudoplusia includens* Walker; и совку бархатных бобов, например *Anticarsia gemmatalis* Hübner, а также виды из отряда *Coleoptera*, в том числе без ограничения западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*) - WCRW, южного кукурузного жука (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) - SCRW и северного кукурузного жука (*Diabrotica barberi*) - NCRW.

Под используемым в данном документе термином "пестицидный токсин" или "пестицидный белок" подразумевают токсин, который обладает токсической активностью в отношении одного или нескольких вредителей, в том числе без ограничения представителей отрядов *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hemiptera* и *Coleoptera* или типа *Nematoda*, или белок, который характеризуется гомологией с таким белком. Пестицидные белки были выделены из организмов, в том числе, например, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Photorhabdus* sp., *Xenorhabdus* sp., *Clostridium bifermentans* и *Paenibacillus popilliae*. Пестицидные белки включают без ограничения инсектицидные белки из *Pseudomonas* sp., такие как PSEEN3174 (Monalysin; (2011) *PLoS Pathogens* 7:1-13); из штамма СНАО и Pf-5 *Pseudomonas protegens* (Pechy-Tarr, (2008) *Environmental Microbiology* 10:2368-2386; № доступа в GenBank EU400157); из *Pseudomonas taiwanensis* (Liu, et al. (2010) *J. Agric. Food Chem.*, 58:12343-12349) и из *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhang, et al., (2009) *Annals of Microbiology* 59:45-50 и Li, et al., (2007) *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:159-168); инсектицидные белки из *Photorhabdus* sp. и *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) *The Open Toxicology Journal* 3:101-118 и Morgan, et al., (2001) *Applied and Envir. Micro.* 67:2062-2069); патент США № 6048838 и патент США № 6379946; полипептид PIP-1 из публикации заявки на патент США US20140007292; полипептид AfIP-1A и/или AfIP-1B из US9475847; полипептид PHI-4 из публикаций заявок на патенты США US20140274885 и US20160040184; полипептид PIP-47 из публикации заявки на патент США № US20160186204, полипептид PIP-72 из публикации заявки на патент США № US20160366891; полипептид PtIP-50 и полипептид PtIP-65 из публикации согласно PCT с № WO2015/120270; полипептид PtIP-83 из публикации согласно PCT с № WO2015/120276; полипептид PtIP-96 из публикации согласно PCT с серийным № PCT/US15/55502; полипептид IPD079 из публикации согласно PCT с № WO2017/23486; полипептид IPD082 из патентного документа США с серийным № PCT/US16/65531, полипептид IPD093 из патентного документа США с серийным № 62/434020; полипептид IPD080 из патентного документа США с серийным № US62/411318; и δ-эндотоксины, в том числе без ограничения генами δ-эндотоксинов классов Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry15, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry22, Cry23, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry28, Cry29, Cry30, Cry31, Cry32, Cry33, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry38, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry45, Cry46, Cry47, Cry49, Cry50, Cry51, Cry52, Cry53, Cry54, Cry55, Cry56, Cry57, Cry58, Cry59, Cry60, Cry61, Cry62, Cry63, Cry64, Cry65, Cry66, Cry67, Cry68, Cry69, Cry70, Cry71, и Cry72 и генами цитолитических токсинов *cyt1* и *cyt2* *B. thuringiensis*. Представители этих классов инсектицидных белков из *B. thuringiensis* хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на веб-сайте по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ к которому можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www").

Примеры δ -эндотоксинов также включают без ограничения белки Cry1A из патентов США № 5880275 и 7858849; мутант Cry1Ac из US9512187; токсин DIG-3 или токсин DIG-11 (варианты белков cry с N-концевой делецией α -спирали 1 и/или α -спирали 2, такие как Cry1A, Cry3A) из патентов США № 8304604, 8304605 и 8476226; Cry1B из публикации заявки на патент США с серийным № 10/525318, публикации заявки на патент США № US20160194364 и патентов США № 9404121 и 8772577; варианты Cry1B из публикации согласно PCT с № WO2016/61197 и серийным № PCT/US17/27160; Cry1C из патента США № 6033874; Cry1F из патентов США № 5188960 и 6218188; химеры Cry1A/F из патентов США № 7070982; 6962705 и 6713063); белок Cry2, такой как белок Cry2Ab из патента США № 7064249); белок Cry3A, в том числе без ограничения созданный с помощью генной инженерии гибридный инсектицидный белок (eHIP), полученный путем слияния уникальных комбинаций вариабельных участков и консервативных блоков по меньшей мере двух различных белков Cry (публикация заявки на патент США № 2010/0017914); белок Cry4; белок Cry5; белок Cry6; белки Cry8 из патентов США № 7329736, 7449552, 7803943, 7476781, 7105332, 7339092, 7378499, 7462760 и 9593345; белок Cry9, например представители семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F, в том числе белок Cry9 из патента США 9000261 и 8802933 и патентного документа США с серийным № 62/287281; белок Cry15 из Naimov, et al., (2008) Applied and Environmental Microbiology, 74:7145-7151; белок Cry14 из патента США № US8933299; Cry22, белок Cry34Ab1 из патентов США № 6127180, 6624145 и 6340593; усеченный белок Cry34 из патента США № US8816157; белок CryET33 и CryET34 из патентов США № 6248535, 6326351, 6399330, 6949626, 7385107 и 7504229; гомологи CryET33 и CryET34 из публикации заявок на патент США № 2006/0191034, 2012/0278954 и публикации согласно PCT с № WO 2012/139004; белок Cry35Ab1 из патентов США № 6083499, 6548291 и 6340593; белок Cry46 из патента США № 9403881, белок Cry 51, бинарный токсин Cry; TIC901 или родственный токсин; TIC807 из публикации заявки на патент США № 2008/0295207; TIC853 из патента США US8513493; ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127, TIC128 из PCT US 2006/033867; сконструированные токсичные белки полужесткокрылых из публикации заявки на патент США № US20160150795, AXMI-027, AXMI-036 и AXMI-038 из патента США № 8236757; AXMI-031, AXMI-039, AXMI-040, AXMI-049 из патента США № 7923602; AXMI-018, AXMI-020 и AXMI-021 из WO 2006/083891; AXMI-010 из WO 2005/038032; AXMI-003 из WO 2005/021585; AXMI-008 из публикации заявки на патент США № 2004/0250311; AXMI-006 из публикации заявки на патент США № 2004/0216186; AXMI-007 из публикации заявки на патент США № 2004/0210965; AXMI-009 из заявки на патент США № 2004/0210964; AXMI-014 из публикации заявки на патент США № 2004/0197917; AXMI-004 из публикации заявки на патент США № 2004/0197916; AXMI-028 и AXMI-029 из WO 2006/119457; AXMI-007, AXMI-008, AXMI-008orf2, AXMI-009, AXMI-014 и AXMI-004 из WO 2004/074462; AXMI-150 из патента США № 8084416; AXMI-205 из публикации заявки на патент США № 2011/0023184; AXMI-011, AXMI-012, AXMI-013, AXMI-015, AXMI-019, AXMI-044, AXMI-037, AXMI-043, AXMI-033, AXMI-034, AXMI-022, AXMI-023, AXMI-041, AXMI-063 и AXMI-064 из публикации заявки на патент США № 2011/0263488; AXMI046, AXMI048, AXMI050, AXMI051, AXMI052, AXMI053, AXMI054, AXMI055, AXMI056, AXMI057, AXMI058, AXMI059, AXMI060, AXMI061, AXMI067, AXMI069, AXMI071, AXMI072, AXMI073, AXMI074, AXMI075, AXMI087, AXMI088, AXMI093, AXMI070, AXMI080, AXMI081, AXMI082, AXMI091, AXMI092, AXMI096, AXMI097, AXMI098, AXMI099, AXMI100, AXMI101, AXMI102, AXMI103, AXMI104, AXMI107, AXMI108, AXMI109, AXMI110, AXMI111, AXMI112, AXMI114, AXMI116, AXMI117, AXMI118, AXMI119, AXMI120, AXMI121, AXMI122, AXMI123, AXMI124, AXMI125, AXMI126, AXMI127, AXMI129, AXMI151, AXMI161, AXMI164, AXMI183, AXMI132, AXMI137, AXMI138 из патента США US8461421 и US8461422; AXMI-R1 и родственные белки из публикации заявки на патент США № 2010/0197592; AXMI221Z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z и AXMI225z из WO 2011/103248; AXMI218, AXMI219, AXMI220, AXMI226, AXMI227, AXMI228, AXMI229, AXMI230 и AXMI231 из WO 2011/103247; AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 и AXMI-184 из патента США № 8334431; AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 и AXMI-045 из публикации заявки на патент США № 2010/0298211; AXMI-066 и AXMI-076 из публикации заявки на патент США № 2009/0144852; AXMI128, AXMI130, AXMI131, AXMI133, AXMI140, AXMI141, AXMI142, AXMI143, AXMI144, AXMI146, AXMI148, AXMI149, AXMI152, AXMI153, AXMI154, AXMI155, AXMI156, AXMI157, AXMI158, AXMI162, AXMI165, AXMI166, AXMI167, AXMI168, AXMI169, AXMI170, AXMI171, AXMI172, AXMI173, AXMI174, AXMI175, AXMI176, AXMI177, AXMI178, AXMI179, AXMI180, AXMI181, AXMI182, AXMI185, AXMI186, AXMI187, AXMI188, AXMI189 из патента США № 8318900; AXMI079, AXMI080, AXMI081, AXMI082, AXMI091, AXMI092, AXMI096, AXMI097, AXMI098, AXMI099, AXMI100, AXMI101, AXMI102, AXMI103, AXMI104, AXMI107, AXMI108, AXMI109, AXMI110, dsAXMI111, AXMI112, AXMI114, AXMI116, AXMI117, AXMI118, AXMI119, AXMI120, AXMI121, AXMI122, AXMI123, AXMI124, AXMI1257, AXMI1268, AXMI127, AXMI129, AXMI164, AXMI151, AXMI161, AXMI183, AXMI132, AXMI138, AXMI137 of US Patent US8461421; AXMI192 из патента США US8461415; AXMI281 из публикации заявки на патент США № US20160177332; AXMI422 из патента США № US8252872; белки cry, такие как Cry1A и Cry3A, с модифи-

цированными сайтами протеолитического расщепления из патента США № 8319019; белок-токсин Cry1Ac, Cry2Aa и Cry1Ca из штамма VBTS 2528 *Bacillus thuringiensis* из публикации заявки на патент США № 2011/0064710. Белки Cry MP032, MP049, MP051, MP066, MP068, MP070, MP091S, MP109S, MP114, MP121, MP134S, MP183S, MP185S, MP186S, MP195S, MP197S, MP208S, MP209S, MP212S, MP214S, MP217S, MP222S, MP234S, MP235S, MP237S, MP242S, MP243, MP248, MP249S, MP251M, MP252S, MP253, MP259S, MP287S, MP288S, MP295S, MP296S, MP297S, MP300S, MP304S, MP306S, MP310S, MP312S, MP314S, MP319S, MP325S, MP326S, MP327S, MP328S, MP334S, MP337S, MP342S, MP349S, MP356S, MP359S, MP360S, MP437S, MP451S, MP452S, MP466S, MP468S, MP476S, MP482S, MP522S, MP529S, MP548S, MP552S, MP562S, MP564S, MP566S, MP567S, MP569S, MP573S, MP574S, MP575S, MP581S, MP590, MP594S, MP596S, MP597, MP599S, MP600S, MP601S, MP602S, MP604S, MP626S, MP629S, MP630S, MP631S, MP632S, MP633S, MP634S, MP635S, MP639S, MP640S, MP644S, MP649S, MP651S, MP652S, MP653S, MP661S, MP666S, MP672S, MP696S, MP704S, MP724S, MP729S, MP739S, MP755S, MP773S, MP799S, MP800S, MP801S, MP802S, MP803S, MP805S, MP809S, MP815S, MP828S, MP831S, MP844S, MP852, MP865S, MP879S, MP887S, MP891S, MP896S, MP898S, MP935S, MP968, MP989, MP993, MP997, MP1049, MP1066, MP1067, MP1080, MP1081, MP1200, MP1206, MP1233, и MP1311 из патентного документа США с серийным № 62/429426. Инсектицидная активность белков Cry хорошо известна специалисту в данной области техники (для обзора см. van Franckenhuyzen, (2009) *J. Invert. Path.* 101:1-16). Применение белков Cry в качестве признаков трансгенного растения хорошо известно специалисту в данной области техники, и трансгенные растения с Cry, в том числе без ограничения растения, экспрессирующие Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A, Cry9c и CBI-Bt, были одобрены контролирующими органами (см., Sanahuja, (2011) *Plant Biotech Journal* 9:283-300 и CERA. (2010) базу данных ГМ растений центра по оценке риска для окружающей среды (CERA), Исследовательский фонд ILSI, г. Вашингтон на веб-сайте по адресу cera-gmc.org/index.php?action=gmc_crop_database, доступ к которым можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www"). В растениях также может экспрессироваться более одного пестицидных белков, хорошо известных специалисту в данной области техники, таких как Vip3Ab и Cry1Fa (US2012/0317682); Cry1BE и Cry1F (US2012/0311746); Cry1CA и Cry1AB (US2012/0311745); Cry1F и CryCa (US2012/0317681); Cry1DA и Cry1BE (US2012/0331590); Cry1DA и Cry1Fa (US2012/0331589); Cry1AB и Cry1BE (US2012/0324606); Cry1Fa и Cry2Aa и Cry1I и Cry1E (US2012/0324605); Cry34Ab/35Ab и Cry6Aa (US20130167269); Cry34Ab/VCry35Ab и Cry3Aa (US20130167268); а также Cry3A и Cry1Ab или Vip3Aa (US9045766). Пестицидные белки включают также инсектицидные липазы, в том числе ацилгидролазы липидов из патента США № 7491869 и холестерин-оксидазы, как, например, из *Streptomyces* (Purcell et al. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 15:1406-1413). Пестицидные белки также включают токсины VIP (вегетативные инсектицидные белки) из патентов США № 5877012, 6107279, 6137033, 7244820, 7615686 и 8237020 и т.п. Другие белки VIP хорошо известны специалисту в данной области техники (см. веб-сайт по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с применением приставки "www"). Пестицидные белки также включают белки токсинного комплекса (ТС), которые можно получить из таких организмов, как *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* и *Raenibacillus* (см. патенты США № 7491698 и 8084418). Некоторые ТС-белки обладают "самостоятельной" инсектицидной активностью, а другие ТС-белки повышают активность самостоятельных токсинов, вырабатываемых тем же указанным организмом. Токсичность "самостоятельного" ТС-белка (например, из *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* или *Raenibacillus*) может повышаться с помощью одного или нескольких ТС-белков, "усилителей", полученных из организма-источника из другого рода. Существуют три основных типа ТС-белков. Как изложено в данном документе, белки класса А ("белок А") представляют собой самостоятельные токсины. Белки класса В ("белок В") и белки класса С ("белок С") повышают токсичность белков класса А. Примерами белков класса А являются TcbA, TcdA, XptA1 и XptA2. Примерами белков класса В являются TcaC, TcdB, XptB1Xb и XptC1Wi. Примерами белков класса С являются TccC, XptC1Xb и XptB1Wi. Пестицидные белки также включают белки яда пауков, змей и скорпионов. Примеры пептидов яда пауков включают без ограничения пептиды ликотоксин-1 и его мутантные формы (патент США № 8334366).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды IPD090 включают аминокислотные последовательности, выведенные из последовательностей нуклеиновой кислоты полной длины, раскрытых в данном документе, и аминокислотные последовательности, которые короче, чем последовательности полной длины, либо полученные в результате применения альтернативного сайта инициации, расположенного ниже, либо в результате процессинга, дающего более короткий белок с пестицидной активностью. Процессинг может происходить в организме, в котором экспрессируется белок, или во вредителе после поглощения белка.

Таким образом, в данном документе предусмотрены новые выделенные или рекомбинантные последовательности нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают пестицидную активность. Также предусмотрены аминокислотные последовательности полипептидов IPD090. Белок, полученный в результате трансляции генов этих IPD090, в клетках обеспечивает возможность контроля или уничтожения вредителей, которые поглощают их.

Белки IPD090, а также их варианты и фрагменты.

Полипептиды IPD090 охвачены настоящим изобретением. Термины "полипептид IPD090" и "белок IPD090", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полипептиду с инсектицидной активностью, в том числе без ограничения инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких насекомых-вредителей из отрядов Lepidoptera и/или Coleoptera, и достаточно гомологичному полипептиду IPD090Aa с SEQ ID NO: 2. Предполагается ряд полипептидов IPD090. Источники полипептидов IPD090 или родственных белков включают виды бактерий, выбранные без ограничения из видов рода *Pseudomonas* и *Woodsholea*. Выравнивание аминокислотных последовательностей гомологов полипептида IPD090 (например, на фиг. 1) обеспечивает возможность идентификации остатков, которые являются высококонсервативными среди естественных гомологов в данном семействе.

Термин "достаточно гомологичная" используется в данном документе для обозначения аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 большей гомологией последовательности при сравнении с эталонной последовательностью с помощью одной из программ выравнивания, описанных в данном документе, с использованием стандартных параметров. В некоторых вариантах осуществления гомологию последовательности определяют относительно последовательности полной длины полипептида IPD090. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида IPD090 по меньшей мере на приблизительно 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 больше идентична последовательности при сравнении с последовательностью с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384. Термин "приблизительно" при использовании в данном документе в контексте процентной идентичности последовательности означает +/- 0,5%. Специалисту в данной области будет понятно, что эти значения можно соответствующим образом скорректировать для определения соответствующей гомологии белков, принимая во внимание аминокислотное сходство и т.п. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают по всей длине полипептида с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами.

Используемые в данном документе термины "белок", "пептидная молекула" или "полипептид" включают любую молекулу, которая содержит пять или больше аминокислот. Из уровня техники хорошо известно, что белковые, пептидные или полипептидные молекулы могут подвергаться модификации, в том числе посттрансляционным модификациям, таким как без ограничения образование дисульфидных связей, гликозилирование, фосфорилирование или олигомеризация. Таким образом, используемые в данном документе термины "белок", "пептидная молекула" или "полипептид" включают в себя любой белок, который модифицирован посредством какого-либо биологического или небиологического процесса. Термины "аминокислота" и "аминокислоты" относятся ко всем встречающимся в природе L-аминокислотам.

Термин "рекомбинантный белок" применяется в данном документе для обозначения белка, который более не находится в своей естественной среде, например *in vitro*, или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. Полипептид IPD090, который фактически не содержит клеточный материал, включает препараты белка, имеющие менее приблизительно 30, 20, 10 или 5% (по сухому весу) белка, не относящегося к пестицидному (также называемого в данном документе "загрязняющим белком").

Термины "фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептида, содержащие аминокислотные последовательности, достаточно идентичные полипептиду IPD090 и которые проявляют инсектицидную активность. Термины "фрагменты" или "биологически активные части" полипептидов IPD090 включают фрагменты, содержащие аминокислотные последовательности, достаточно идентичные аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384, где полипептид IPD090 характеризуется инсектицидной активностью. Такие биологически активные части можно получать с помощью рекомбинантных методик и оценивать в отношении инсектицидной активности. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полипептида IPD090 представляет собой N-концевое и/или C-концевое усечение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или больше аминокислот с N-конца и/или C-конца относительно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384, например, путем протеолиза, путем вставки старт-кодона, путем делеции кодонов, кодирующих удаляемые аминокислоты, и одновременной вставки старт-кодона и/или вставки стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полипептида IPD090 представляет собой N-концевое усечение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 аминокислот с N-конца SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или

SEQ ID NO: 384. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полипептида IPD090 представляет собой N-концевое и/или C-концевое усечение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или больше аминокислот с N-конца и/или C-конца относительно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полипептида IPD090 содержит аминокислоты 1-315, аминокислоты 1-330, аминокислоты 1-349, аминокислоты 1-450, аминокислоты 25-315, аминокислоты 25-330, аминокислоты 25-349, аминокислоты 25-450 или аминокислоты 25-483 из любого из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384. В некоторых вариантах осуществления усеченный вариант представляет собой полипептид с SEQ ID NO: 10.

Термин "варианты", используемый в данном документе, относится к белкам или полипептидам с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентична исходной аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 больше идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384, где полипептид IPD090 характеризуется инсектицидной активностью.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентична по всей длине аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают по всей длине полипептида с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентична по всей длине аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 или больше аминокислотными заменами по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида IPD090 содержит любую одну или несколько аминокислотных замен, соответствующих положениям 3, 4, 8, 12, 15, 16, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 38, 46, 47, 50, 52, 55, 62, 63, 67, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 80, 90, 91, 94, 99, 100, 108, 115, 127, 129, 161, 169, 175, 177, 178, 180, 185, 207, 213, 223, 240, 241, 247, 255, 266, 273, 275, 277, 278, 287, 288, 302, 306, 309, 310, 311, 312, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 391, 392, 395, 397, 400, 401, 402, 405, 407, 410, 423, 425, 426, 431, 433, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 457, 458, 459, 460, 468, и 471 SEQ ID NO: 2 в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида IPD090 содержит любую одну или несколько активных аминокислотных замен из табл. 10 и/или 12.

Способы осуществления таких манипуляций, как правило, известны в данной области. Например, варианты аминокислотной последовательности полипептида IPD090 можно получать с помощью мутаций в ДНК. Это также можно осуществлять с помощью одной из нескольких форм мутагенеза и/или путем направленной эволюции. В некоторых аспектах изменения, закодированные в аминокислотной последовательности, не будут существенно влиять на функцию белка. Такие варианты будут обладать требуемой пестицидной активностью. Однако понятно, что способность полипептида IPD090 обеспечивать пестицидную активность можно повышать путем применения таких методик в композициях согласно настоящему изобретению.

Например, можно делать консервативные аминокислотные замены по одному или нескольким прогнозируемым несущественным аминокислотным остаткам. "Несущественный" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который можно изменять относительно последовательности полипептида

IPD090 дикого типа без изменения биологической активности. Несущественные аминокислотные остатки можно идентифицировать посредством выравнивания родственных гомологов IPD090, таких как показанные на фиг. 1. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен на аминокислотный остаток, имеющий аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, были определены в уровне техники. Эти семейства включают: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин); кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту); полярными отрицательно заряженными остатками и их амидами (например, аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту, глутамин); незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин); небольшими алифатическими неполярными или слабополярными остатками (например, аланин, серин, треонин, пролин, глицин); неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); крупными алифатическими неполярными остатками (например, метионин, лейцин, изолейцин, валин, цистин); бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин); ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин); крупными ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан).

Аминокислотные замены можно проводить в неконсервативных участках, которые сохраняют функцию. В целом, такие замены не следует проводить для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве, где такие остатки являются существенными для активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть существенными для активности белка, включают, например, остатки, которые идентичны у всех белков, содержащихся в выравнивании аналогичных или родственных токсинов с последовательностями согласно вариантам осуществления (например, остатки, которые идентичны при выравнивании гомологичных белков). Примеры остатков, которые являются консервативными, но которые могут позволять консервативные аминокислотные замены и все еще сохранять активность, включают, например, остатки, которые характеризуются только консервативными заменами у всех белков, содержащихся в выравнивании аналогичных или родственных токсинов с последовательностями согласно вариантам осуществления (например, остатки, которые характеризуются только консервативными заменами у всех белков, содержащихся в выравнивании гомологичных белков). Однако специалисту в данной области будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения в консервативном остатке. Указания в отношении подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность белка, представляющего интерес, можно найти в модели Dayhoff, et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включенного в данный документ посредством ссылки.

При осуществлении таких изменений можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот для обеспечения согласованной биологической функции белка в целом понятна из уровня техники (Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 157(1):105-32). При этом, что относительная гидропатичность аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру полученного в результате белка, что в свою очередь определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Из уровня техники известно, что определенные аминокислоты можно замещать другими аминокислотами, имеющими аналогичный индекс или показатель гидропатичности, и в результате по-прежнему получать белок с аналогичной биологической активностью, т.е. по-прежнему получают эквивалентный белок с биологической функцией. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и зарядных характеристик (Kyte and Doolittle, *ibid*). Они являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5). При осуществлении таких изменений предпочтительной является замена аминокислот, индексы гидропатичности которых находятся в пределах до +2, особенно предпочтительной тех с индексами в пределах до +1 и даже более предпочтительной тех с индексами в пределах до +0,5.

Из уровня техники также понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно проводить на основании гидрофильности. В патенте США № 4554101 заявляется, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью смежных аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка.

Как подробно описано в патенте США № 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0.+0,1); глутамат (+3,0.+0,1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5.+0,1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4).

В качестве альтернативы изменения можно совершать в боковой последовательности многих белков на амино- или карбокси-конце без существенного влияния на активность. Они могут включать встав-

ки, делеции или изменения, введенные с помощью современных молекулярных способов, таких как ПЦР, в том числе амплификации посредством ПЦР, которые изменяют или расширяют последовательность, кодирующую белок, за счет включения последовательностей, кодирующих аминокислоты, в олигонуклеотиды, используемые при амплификации посредством ПЦР. В качестве альтернативы добавленные белковые последовательности могут включать последовательности, кодирующие весь белок, например такие, которые обычно применяют в области техники для получения слияний белков. Такие слитые белки часто применяют для (1) повышения экспрессии белка, представляющего интерес, (2) введения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа для облегчения либо очистки белка, выявления белка либо других экспериментальных применений, известных из уровня техники, (3) нацеливания секреции или трансляции белка во внутриклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий, митохондрия или хлоропласты растений или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, причем последнее зачастую приводит к гликозилированию белка.

Вариантные нуклеотидные и аминокислотные последовательности по настоящему изобретению также охватывают последовательности, полученные в результате процедур, связанных с мутациями и рекомбинациями, такими как ДНК-шаффлинг. С помощью такой процедуры один или несколько различных кодирующих участков полипептида IPD090 можно применять для создания нового полипептида IPD090, обладающего требуемыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов создают из популяции родственных по последовательностям полинуклеотидов, содержащих участки последовательностей, которые характеризуются значительной идентичностью последовательности и могут подвергаться гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с использованием данного подхода мотивы с кодирующими домен последовательностями, представляющий интерес, можно подвергать шаффлингу между пестицидным геном и другими известными пестицидными генами с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным свойством, представляющим интерес, таким как повышенная инсектицидная активность. Стратегии для такого ДНК-шаффлинга известны из уровня техники. См., например, Stemmer, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer, (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer, et al., (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore, et al., (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang, et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer, et al., (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США № 5605793 и 5837458.

Замена доменов или шаффлинг представляет собой другой механизм получения измененных полипептидов IPD090. Можно проводить замену доменов между полипептидами IPD090, что дает гибридные или химерные токсины с повышенной пестицидной активностью или расширенным спектром мишеней. Способы получения рекомбинантных белков и тестирования их в отношении пестицидной активности хорошо известны из уровня техники (см., например, Naimov, et al., (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd, et al., (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge, et al., (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf, et al., (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang, et al., (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Филогенетический анализ, анализ мотивов последовательности и структурный анализ семейств инсектицидных белков. Можно применять способ анализа последовательности и структуры, который состоит из четырех компонентов: построение филогенетического дерева, обнаружение мотивов белковой последовательности, прогнозирование вторичной структуры и выравнивание белковых последовательностей и вторичных структур. Подробные описания каждого компонента проиллюстрированы ниже.

1) Построение филогенетического дерева.

Филогенетический анализ можно выполнять с применением программного обеспечения MEGA5. Белковые последовательности можно подвергать анализу с использованием ClustalW версии 2 (Larkin M.A et al (2007) *Bioinformatics* 23(21):2947-2948) для множественного выравнивания последовательностей. Затем определяют эволюционную историю с помощью способа максимального правдоподобия, исходя из модели на основе JTT-матрицы. Получают дерево с наивысшим логарифмическим правдоподобием, экспортируют его в формат Newick, и дополнительно обрабатывают для извлечения ID последовательностей в том же порядке, в котором они представлены на дереве. Некоторые клады, представляющие подсемейства, можно идентифицировать вручную для каждого семейства инсектицидных белков.

2) Обнаружение мотивов белковой последовательности.

Белковые последовательности перегруппировывают согласно ранее построенному филогенетическому дереву и вводят в средство для анализа МОТИВОВ MEME (Multiple EM for MOTIF Elicitation) (Bailey T.L., and Elkan C., *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.) для идентификации ключевых мотивов последовательности. Начальные настройки MEME являются следующими: минимальное количество сайтов 2, минимальный размер мотива 5 и максимальное количество мотивов 30. Мотивы последовательности, уникальные для каждого подсемейства, идентифицировали с помощью визуального осмотра. Распределение мотивов по всему семейству генов можно было визуализировать на HTML-вебстранице. Мотивы нумеруют согласно расположению E-значения для каждого мотива.

3) Прогнозирование вторичной структуры.

PSIPRED, ведущую технологию прогнозирования вторичной структуры (Jones DT. (1999) *J. Mol. Biol.* 292: 195-202), можно применять для прогнозирования вторичной структуры белка. Средство обеспечивает точное прогнозирование структуры с применением двух нейронных цепей прямой связи, исходя из результата PSI-BLAST. Базу данных для PSI-BLAST создают путем удаления участков низкой сложности, трансмембранного участка и участков суперспирали в Uniref100. Результаты PSIPRED содержат прогнозируемые вторичные структуры (альфа-спираль: H, бета-тяж: E и клубок: C) и соответствующую степень уверенности для каждой аминокислоты в данной белковой последовательности.

4) Выравнивание белковых последовательностей и вторичных структур.

Можно разработать скрипт для создания выравнивания вторичных структур с гэпами согласно множественному выравниванию белковых последовательностей из стадии 1 для всех белков. Все подвергнутые выравниванию белковые последовательности и структуры комбинируют в единый файл FASTA, а затем импортируют в MEGA для визуализации и идентификации консервативных структур.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 характеризуется модифицированным физическим свойством.

Используемый в данном документе термин "физическое свойство" относится к любому параметру, который подходит для описания физико-химических характеристик белка. Используемые в данном документе термины "физическое свойство, представляющее интерес" и "свойство, представляющее интерес" используются взаимозаменяемо для обозначения физических свойств белков, подлежащих исследованию и/или модификации. Примеры физических свойств включают без ограничения суммарный поверхностный заряд и распределение зарядов на поверхности белка, суммарную гидрофобность и распределение гидрофобных остатков на поверхности белка, плотность поверхностного заряда, плотность гидрофобности поверхности, общее число поверхностных ионизируемых групп, поверхностное натяжение, размер белка и его распределение в растворе, температуру плавления, теплоемкость и второй вириальный коэффициент. Примеры физических свойств также включают полипептид IPD090, характеризующийся повышенной экспрессией, повышенной растворимостью, сниженной фитотоксичностью и усвояемостью протеолитических фрагментов в кишечнике насекомого. Модели для расщепления с помощью искусственного желудочного сока известны специалисту в данной области техники (Fuchs, R.L. and J.D. Astwood. *Food Technology* 50: 83-88, 1996; Astwood, J.D., et al *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273, 1996; Fu TJ et al *J. Agric Food Chem.* 50: 7154-7160, 2002).

В некоторых вариантах осуществления варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Вариантные белки, охваченные настоящим изобретением, являются биологически активными, то есть они все еще обладают требуемой биологической активностью (т.е. пестицидной активностью) нативного белка. В некоторых вариантах осуществления вариант будет обладать по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80% или большей инсектицидной активностью нативного белка. В некоторых вариантах осуществления варианты могут обладать усиленной активностью по сравнению с нативным белком.

Бактериальные гены довольно часто имеют несколько метиониновых инициаторных кодонов близости от стартового сайта открытой рамки считывания. Зачастую, инициация трансляции по одному или нескольким из этих старт-кодонов будет приводить к образованию функционального белка. Эти старт-кодона могут включать кодоны ATG. Однако бактерии, такие как *Bacillus sp.*, также распознают кодон GTG в качестве старт-кодона, и белки, трансляция которых иницируется по кодонам GTG, в качестве первой аминокислоты содержат метионин. В редких случаях, трансляция в бактериальных системах может иницироваться по кодону TTG, хотя в таком случае TTG кодирует метионин. Кроме того, зачастую априори не определяют, какой из этих кодонов естественным образом используется в бактерии. Таким образом понятно, что применение одного из взаимных метиониновых кодонов может также приводить к образованию пестицидных белков. Эти пестицидные белки охватываются настоящим изобретением и могут применяться в способах по настоящему изобретению. Будет понятно, что при экспрессии в растениях будет необходимо изменить взаимный стартовый кодон на ATG для надлежащей трансляции.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ

ID NO: 4; и b) С-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от приблизительно 383 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от 1 до приблизительно 422 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от приблизительно 423 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от 1 до приблизительно 442 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от приблизительно 443 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 144, аминокислоты от 1 до приблизительно 239, аминокислоты от 1 до приблизительно 296, аминокислоты от 1 до приблизительно 348, аминокислоты от 1 до приблизительно 382, аминокислоты от 1 до приблизительно 422, аминокислоты от 1 до приблизительно 442 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 146 до приблизительно 483, аминокислоты от приблизительно 241 до приблизительно 483, аминокислоты от приблизительно 297 до приблизительно 483, аминокислоты от приблизительно 349 до приблизительно 483, аминокислоты от приблизительно 383 до приблизительно 483, аминокислоты от приблизительно 423 до приблизительно 483 или аминокислоты от приблизительно 443 до приблизительно 483 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 144 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 146 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 239 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 241 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 296 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 297 до приблизительно 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 348 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 349 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 382 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 383 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 422 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 423 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид IPD090 содержит а) N-концевой участок, содержащий аминокислоты от 1 до приблизительно 442 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и b) С-концевой участок, содержащий аминокислоты от приблизительно 443 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В других вариантах осуществления полипептид IPD090 может экспрессироваться в виде белка-предшественника со вставочной последовательностью, которая катализирует многостадийный посттрансляционный сплайсинг белка. Сплайсинг белка предусматривает вырезание вставочных последовательностей из полипептида с одновременным присоединением фланкирующих последовательностей с получением нового полипептида (Chong, et al., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271:22159-22168). Эта вставочная последовательность или элемент сплайсинга белка, называемые интеинами, которые катализируют свое собственное вырезание посредством трех согласованных реакций на N-терминальной и С-терминальной границах сплайсинга: ацильной перестройки N-терминального цистеина или серина; реакции перэтерификации между двумя концами с образованием разветвленного сложноэфирного или тиоэфирного промежуточного соединения и расщепления пептидной связи, сопряженного с образованием кольца с участием С-терминального аспарагина интеина с высвобождением интеина (Evans, et al., (2000) *J. Biol. Chem.*, 275:9091-9094). Выяснение механизма сплайсинга белка привело к возникновению ряда применений, связанных с интеинами (Comb et al., патент США № 5496714; Comb et al., патент США № 5834247; Camarero and Muir, (1999) *J. Amer. Chem. Soc.* 121:5597-5598; Chong, et al., (1997) *Gene* 192:271-281, Chong, et al., (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:5109-5115; Chong, et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:10567-10577;

Cotton, et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121:1100-1101; Evans, et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18359-18363; Evans, et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:3923-3926; Evans, et al., (1998) *Protein Sci.* 7:2256-2264; Evans, et al., (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9091-9094; Iwai and Pluckthun, (1999) *FEBS Lett.* 459:166-172; Mathys, et al., (1999) *Gene* 231:1-13; Mills, et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3543-3548; Muir, et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6705-6710; Otomo, et al., (1999) *Biochemistry* 38:16040-16044; Otomo, et al., (1999) *J. Biomol. NMR* 14:105-114; Scott, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13638-13643; Severinov and Muir, (1998) *J. Biol. Chem.* 273:16205-16209; Shingledecker, et al., (1998) *Gene* 207:187-195; Southworth, et al., (1998) *EMBO J.* 17:918-926; Southworth, et al., (1999) *Biotechniques* 27:110-120; Wood, et al., (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:889-892; Wu, et al., (1998a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9226-9231; Wu, et al., (1998b) *Biochim Biophys Acta* 1387:422-432; Xu, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:388-393; Yamazaki, et al., (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, 120:5591-5592). Относительно применения интеинов в растительных трансгенах см. Yang, et al., (*Transgene Res* 15:583-593 (2006)) и Evans, et al., (*Annu. Rev. Plant Biol.* 56:375-392 (2005)).

В другом аспекте полипептид IPD090 может кодироваться двумя отдельными генами, при этом интеин белка-предшественника берет начало от двух генов, он называется сплит-интеин, и две части предшественника соединяются за счет образования пептидной связи. Это образование пептидной связи осуществляется с помощью транссплайсинга, опосредованного интеином. Для этой цели первая и вторая кассеты экспрессии, содержащие два отдельных гена, дополнительно кодируют интеины, способные опосредовать транссплайсинг белков. С помощью транс-сплайсинга белки и полипептиды, кодируемые первым и вторым фрагментами, могут быть связаны путем образования пептидной связи. Интеины транссплайсинга можно выбирать из ядерного генома или генома органелл различных организмов, в том числе эукариот, архебактерий и эубактерий. Интеины, которые можно применять, перечислены на веб-сайте по адресу neb.com/neb/inteins.html, доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с применением приставки "www". Нуклеотидную последовательность, кодирующую интеин, можно разделять на 5'-часть и 3'-часть, которые кодируют соответственно 5'-часть и 3'-часть интеина. Части последовательности, которые не являются необходимыми для интеин-сплайсинга (например, домен хоминг-эндонуклеазы), могут быть удалены. Интеин-кодирующая последовательность расщепляется, так что 5'- и 3'-части способны к транс-сплайсингу. Для выбора подходящего сайта расщепления интеин-кодирующей последовательности можно следовать соображениям, опубликованным у Southworth, et al., (1998) *EMBO J.* 17:918-926. При конструировании первой и второй кассет экспрессии 5'-последовательность, кодирующую интеин, соединяют с 3'-концом первого фрагмента, кодирующего N-концевую часть полипептида IPD090, а 3'-последовательность, кодирующую интеин, соединяют с 5'-концом второго фрагмента, кодирующего C-концевую часть полипептида IPD090.

В целом партнеров для транс-сплайсинга можно конструировать с использованием любого сплит-интеина, в том числе любых встречающихся в природе или искусственно расщепленных сплит-интеинов. Известны несколько встречающихся в природе сплит-интеинов, например сплит-интеин гена DnaE *PCC6803 Synechocystis* sp. (см. Wu, et al., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(16):9226-31 и Evans, et al., (2000) *J Biol Chem.* 275(13):9091-4 и гена DnaE из *Nostoc punctiforme* (см. Iwai, et al., (2006) *FEBS Lett.* 580(7):1853-8). Интеины, не относящиеся к сплит-интеинам, были искусственно расщеплены в лаборатории с созданием новых сплит-интеинов, например искусственно расщепленный интеин *Ssp DnaB* (см. Wu, et al., (1998) *Biochim Biophys Acta.* 1387:422-32), и расщепленный интеин *Scv VMA* (см. Brenzel, et al., (2006) *Biochemistry.* 45(6):1571-8), и искусственно расщепленный грибной мини-интеин (см. Elleuche, et al., (2007) *Biochem Biophys Res Commun.* 355(3):830-4). Также доступны базы данных по интеинам, в которых перечислены известные интеины (см., например, базу данных, доступную онлайн на веб-сайте по адресу bioinformatics.weizmann.ac.il/~pietro/inteins/Inteinstable.html, доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с применением приставки "www").

Встречающиеся в природе интеины, не относящиеся к сплит-интеинам, могут обладать эндонуклеазной или другими видами ферментативной активности, которые, как правило, можно устранять при конструировании искусственно расщепленного сплит-интеина. Такие мини-интеины или минимизированные сплит-интеины хорошо известны из уровня техники и, как правило, они состоят из менее чем 200 аминокислотных остатков в длину (см. Wu, et al., (1998) *Biochim Biophys Acta.* 1387:422-32). Подходящие сплит-интеины могут иметь другие обеспечивающие очистку полипептидные элементы, добавляемые к их структуре, при условии, что такие элементы не подавляют сплайсинг сплит-интеина, или их добавляют таким способом, который дает возможность удалить их перед сплайсингом. Сообщалось о сплайсинге белка с применением белков, которые содержат бактериальные интеин-подобные (BIL) домены (см. Amitai, et al., (2003) *Mol Microbiol.* 47:61-73) и самопроцессирующиеся домены hedgehog (Hog) (последние при объединении с интеинами называют суперсемейством Hog/интеин или семейством HINT (см. Dassa, et al., (2004) *J Biol Chem.* 279:32001-7), и домены, такие как эти, можно также применять для получения искусственно расщепленных интеинов. В частности, не подвергающихся сплайсингу представителей таких семейств можно модифицировать с помощью методов молекулярной биологии для введения или восстановления активности сплайсинга в таких родственниках разнообразиях. Последние исследования показывают, что сплайсинг можно наблюдать при обеспечении реакции N-терминального компонента

сплит-интеина с С-терминальным компонентом сплит-интеина, при этом в естественных условиях он не является его "партнером"; например сплайсинг наблюдали при использовании партнеров, которые всего на 30-50% гомологичны "природному" сплайсинг-партнеру (см. Dassa, et al., (2007) *Biochemistry*. 46(1):322-30). Было показано, что другие такие смеси несовместимых партнеров сплит-интеинов не реагируют друг с другом (см. Brenzel, et al., (2006) *Biochemistry*. 45(6):1571-8). Однако в пределах компетенции специалиста в соответствующей области определить, может ли конкретная пара полипептидов связываться друг с другом с обеспечением функционального интеина, используя стандартные способы и не используя изобретательские навыки.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 представляет собой вариант с круговыми перестановками. В определенных вариантах осуществления полипептид IPD090 представляет собой вариант с круговыми перестановками полипептида с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384, или его вариант, имеющий аминокислотную замену, делецию, добавление или их комбинации. Разработка способов с применением рекомбинантной ДНК обеспечивала возможность исследовать эффекты транспозиции последовательностей в отношении фолдинга, структуры и функции белка. Подход, применяемый при создании новых последовательностей, подобен тому, что происходит со встречающимися в природе парами белков, которые связываются посредством линейной реорганизации их аминокислотных последовательностей (Cunningham, et al., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3218-3222; Teather and Erfle, (1990) *J. Bacteriol.* 172:3837-3841; Schimming, et al., (1992) *Eur. J. Biochem.* 204:13-19; Yamuchi and Minamikawa, (1991) *FEBS Lett.* 260:127-130; MacGregor, et al., (1996) *FEBS Lett.* 378:263-266). Первое *in vitro* применение этого типа перестановки у белков описали Goldenberg и Creighton (*J. Mol. Biol.* 165:407-413, 1983). При создании варианта с круговыми перестановками новый N-конец выбирают во внутреннем сайте (точечный разрыв) оригинальной последовательности, при этом новая последовательность имеет такой же порядок аминокислот, как и оригинальная, от точечного разрыва до тех пор, пока она не достигает аминокислоты, которая находится в оригинальном С-конце или вблизи него. В данной точке новая последовательность присоединяется либо непосредственно, либо через дополнительную часть последовательности (линкер) к аминокислоте, которая находится на оригинальном N-конце или вблизи него, и новая последовательность продолжается такой же последовательностью, что и оригинальная до тех пор, пока она не достигнет точки, которая находится в аминокислоте, которая была N-терминальной по отношению к сайту точечного разрыва оригинальной последовательности, или вблизи него, причем этот остаток образует новый С-конец цепи. Длину аминокислотной последовательности линкера можно выбирать эмпирически, или исходя из информации о структуре, или путем применения комбинации двух этих подходов. Если информация о структуре является недоступной, то можно получить небольшие серии линкеров для тестирования с использованием конструирования, длина которых варьирует для охвата диапазона от 0 до 50 Å и последовательность которых выбрана таким образом, чтобы соответствовать доступности поверхностных групп (гидрофильность, Hopp and Woods, (1983) *Mol. Immunol.* 20:483-489; Kyte and Doolittle, (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132; площади поверхности, доступной воздействию растворителя, Lee and Richards, (1971) *J. Mol. Biol.* 55:379-400) и способности принимать необходимую конформацию без нарушения конфигурации пестицидного полипептида (конформационно подвижный; Karplus and Schulz, (1985) *Naturwissenschaften* 72:212-213). При условии, что при трансляции средняя длина остатка составляет 2,0-3,8 Å, это будет означать, что длина, подлежащая тестированию, будет составлять от 0 до 30 остатков, при этом предпочтительным диапазоном является 0-15 остатков. Примером такой эмпирической серии будет конструирование линкеров с применением кассетной последовательности, такой как Gly-Gly-Gly-Ser, повторяемой *n* раз, где *n* составляет 1, 2, 3 или 4. Специалисты в данной области техники поймут, что существует множество таких последовательностей, варьирующихся по длине или составу, которые могут служить в качестве линкеров, прежде всего учитывая то, что они не являются ни чрезмерно длинными, ни чрезмерно короткими (см. Sandhu, (1992) *Critical Rev. Biotech.* 12:437-462); причем, если они являются слишком длинными, то энтропийные эффекты, вероятно, будут дестабилизировать трехмерную укладку и также могут сделать фолдинг кинетически невыполнимым, а если они являются слишком короткими, то они, вероятно, будут дестабилизировать молекулу вследствие скручивающей или стерической деформации. Специалисты в анализе информации о структуре белка, будут понимать, что при наличии расстояние между концами цепей, определяемое как расстояние между с-альфа атомами углерода, можно применять для определения длины используемой последовательности или, по меньшей мере, для ограничения числа возможностей, которые требуется протестировать при эмпирическом отборе линкеров. Они также будут понимать, что иногда имеет место, когда положения концов полипептидной цепи являются нечеткими в структурных моделях, полученных по данным рентгеноструктурного анализа или ядерной магнитно-резонансной спектроскопии, и в случае такой ситуации, следовательно, ее необходимо принимать во внимание для правильной оценки длины требуемого линкера. На основании остатков, положение которых четко определено, выбирают два остатка, которые близки по последовательности к концам цепи, и расстояние между их с-альфа атомами углерода используют для расчета приблизительной длины для линкера между ними. С использованием расчетной длины в качестве предварительных данных далее отбирают линкеры в пределах диапазона количества остатков (из расчета 2-3,8 Å на остаток). Эти линкеры можно составлять из оригинальной последовательности, укороченной или удлиненной при необходимости, и в случае удлинения можно выби-

рать дополнительные остатки, которые являются гибкими и гидрофильными, как описано выше; или необязательно оригинальная последовательность может замещаться с применением серии линкеров, причем одним примером является вышеупомянутый подход с использованием кассеты Gly-Gly-Gly-Ser; или необязательно можно применять комбинацию оригинальной последовательности и новой последовательности, имеющей подходящую общую длину.

Последовательности пестицидных полипептидов, способных к фолдингу с образованием биологически активных состояний, можно получать путем соответствующего отбора начальных (амино-конец) и конечных (карбоксильный конец) положений из исходной полипептидной цепи, при этом с применением линкерной последовательности, которая описана выше. Амино-конец и карбоксильный конец выбирают из общего отрезка последовательности, называемого участком точечного разрыва, с использованием нижеописанных рекомендаций. Таким образом, новую аминокислотную последовательность получают путем отбора amino-конца и карбоксильного конца из одного участка точечного разрыва. Во многих случаях выбор новых концов будет таким, что оригинальное положение карбоксильного конца непосредственно предшествует положению amino-конца. Однако специалисты в данной области техники поймут, что выборы концов в каком-либо месте в пределах участка могут оказывать влияние, и что это фактически будет приводить либо к удалениям, либо к добавлениям к amino-части или карбоксильной части новой последовательности. Основным положением молекулярной биологии является то, что первичная аминокислотная последовательность белка обуславливает фолдинг в трехмерную структуру, необходимую для проявления его биологической функции. Специалистам в данной области техники известны способы получения и интерпретации информации о трехмерной структуре с применением рентгеноструктурного анализа одиночных кристаллов белка или ядерной магнитно-резонансной спектроскопии растворов белка. Примеры информации о структуре, которая подходит для идентификации участков точечного разрыва, включают расположение и тип вторичной структуры белка (альфа- и 3-10 спирали, параллельные и антипараллельные бета-слои, обращения или повороты цепи и петли; Kabsch and Sander, (1983) *BioPolymers* 22:2577-2637; степень доступности аминокислотных остатков для растворителя, масштаб и тип взаимодействий остатков друг с другом (Chothia, (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53:537-572), а также статическое и динамическое распределение конформаций на протяжении полипептидной цепи (Alber and Mathews, (1987) *Methods Enzymol.* 154:511-533). В некоторых случаях известна дополнительная информация о доступности остатков для растворителя; причем одним примером является сайт посттрансляционного прикрепления углеводов, который обязательно находится на поверхности белка. Если экспериментальная информация о структуре не доступна или ее невозможно получить, то также доступны способы для анализа первичной аминокислотной последовательности с тем, чтобы делать прогнозы о третичной и вторичной структуре белка, доступности для растворителя и наличии поворотов и петель. Для эмпирического определения доступности поверхностных групп также иногда применимы биохимические способы, если прямые способы определения структуры невозможны; например, применение идентификации сайтов деполимеризации после ограниченного протеолиза для того, чтобы делать заключение о доступности поверхностных групп (Gentile and Salvatore, (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:603-621). Таким образом, путем применения либо информации о структуре, полученной экспериментальным путем, либо прогностических способов (например, Srinivisan and Rose, (1995) *Proteins: Struct., Funct. & Genetics* 22:81-99) проводят исследование исходной аминокислотной последовательности для классификации участков в отношении того, важны ли они для поддержания вторичной и третичной структур. Наличие последовательностей в участках, которые, как известно, участвуют в периодической вторичной структуре (альфа и 3-10 спирали, параллельные и антипараллельные бета-слои), следует избегать. Аналогично, участки аминокислотной последовательности, которые, как наблюдается или прогнозируется, обладают низкой степенью доступности для действия растворителя, наиболее вероятно являются частью так называемого гидрофобного ядра белка, и их следует также избегать при выборе amino-конца или карбоксильного конца. В отличие от этого, участки, которые, как известно или прогнозируется, находятся в поверхностных поворотах или петлях, и, в частности, те участки, о которых известно, что они не требуются для биологической активности, являются предпочтительными сайтами для расположения противоположных концов полипептидной цепи. Предпочтительные непрерывные отрезки аминокислотной последовательности, основанные на вышеприведенных критериях, называют участком точечного разрыва. Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды IPD090 с круговыми перестановками с новым N-концом/С-концом, которые содержат линкерный участок, отделяющий оригинальный С-конец и N-конец, по сути, можно получать согласно способу, описанному в Mullins, et al., (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:5529-5533. Несколько стадий амплификации посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяют для перестройки последовательности ДНК, кодирующей первичную аминокислотную последовательность белка. Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды IPD090 с круговыми перестановками с новым N-концом/С-концом, которые содержат линкерный участок, отделяющий оригинальный С-конец и N-конец, можно получать на основе способа tandemных повторов, описанного в Horlick, et al., (1992) *Protein Eng.* 5:427-431. Амплификацию посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов с новыми N-концом/С-концом выполняют с применением ДНК-матрицы с tandemными повторами.

В другом варианте осуществления предусмотрены слитые белки, в аминокислотную последова-

тельность которых включена аминокислотная последовательность, содержащая полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090 по настоящему изобретению. Способы разработки и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области. Полинуклеотиды, кодирующие полипептид IPD090, могут быть слиты с сигнальными последовательностями, которые будут управлять локализацией полипептида IPD090 в конкретных компартментах прокариотической или эукариотической клетки и/или управлять секрецией полипептида IPD090 согласно вариантам осуществления из прокариотической или эукариотической клетки. Например, в *E. coli*, может потребоваться направить экспрессию белка в периплазматическое пространство. Примеры сигнальных последовательностей или белков (или их фрагментов), с которыми можно сливать полипептид IPD090 с тем, чтобы направлять экспрессию полипептида в периплазматическое пространство бактерий, включают без ограничения сигнальную последовательность *relB*, сигнальную последовательность белка, связывающего мальтозу (MBP), MBP, сигнальную последовательность *ompA*, сигнальную последовательность В-субъединицы периплазматического неустойчивого к нагреванию энтеротоксина *E. coli* и сигнальную последовательность щелочной фосфатазы. Для конструирования слитых белков коммерчески доступны несколько векторов, которые будут управлять локализацией белка, такие как серия векторов pMAL (в частности, серия pMAL-p), доступная от New England Biolabs. В конкретном варианте осуществления полипептид IPD090 можно сливать с сигнальной последовательностью пектатлиазы *relB* для увеличения эффективности экспрессии и очистки таких полипептидов в грамотрицательных бактериях (см. патенты США № 5576195 и 5846818). Слияния плазмидный транзитный пептид растения/полипептид хорошо известны из уровня техники. Апоплазматные транзитные пептиды, такие как сигнальная последовательность для секреции альфа-амилазы риса или ячменя, также хорошо известны из уровня техники. Плазмидный транзитный пептид сливают, как правило, со стороны N-конца с полипептидом, подлежащим нацеливанию (например, партнером слияния). В одном варианте осуществления слитый белок состоит, по сути, из плазмидного транзитного пептида и полипептида IPD090, подлежащего нацеливанию. В другом варианте осуществления слитый белок состоит из плазмидного транзитного пептида и полипептида, подлежащего нацеливанию. В таких вариантах осуществления плазмидный транзитный пептид предпочтительно находится на N-конце слитого белка. Однако дополнительные аминокислотные остатки могут находиться на N-конце относительно плазмидного транзитного пептида при условии, что слитый белок, по меньшей мере, частично, нацеливается на плазмиду. В определенном варианте осуществления плазмидный транзитный пептид находится на N-концевой половине, N-концевой трети или N-концевой четверти слитого белка. Как правило, большая часть или весь плазмидный транзитный пептид вырезается из слитого белка после вставки в плазмиду. Положение расщепления может слегка варьировать между видами растений, на различных стадиях развития растения, в результате специфических внутриклеточных условий или конкретной комбинации применяемого транзитного пептида/партнера слияния. В одном варианте осуществления сайт расщепления плазмидного транзитного пептида является гомогенным, за счет чего сайт расщепления является идентичным в популяции слитого белка. В другом варианте осуществления сайт расщепления плазмидного транзитного пептида не является гомогенным, за счет чего сайт расщепления варьирует по 1-10 аминокислотам в популяции слитого белка. Плазмидный транзитный пептид можно рекомбинантно сливать со вторым белком одним из нескольких путей. Например, сайт распознавания рестрикционной эндонуклеазой можно вводить в нуклеотидную последовательность транзитного пептида в положении, соответствующем его C-концу, и такой же или совместимый сайт можно вводить посредством генной инженерии в нуклеотидную последовательность белка, подлежащего нацеливанию, по его N-концу. При конструировании этих сайтов необходимо следить за тем, чтобы кодирующие последовательности транзитного пептида и второго белка содержались "в рамке" для обеспечения синтеза требуемого слитого белка. В некоторых случаях предпочтительным может быть удаление инициаторного метионина второго белка при введении нового сайта рестрикции. Введение сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы в обе исходные молекулы и их последующее соединение посредством методик с использованием рекомбинантной ДНК может приводить к добавлению одной или нескольких дополнительных аминокислот между транзитным пептидом и вторым белком. Как правило, это не влияет на нацеливающую активность, поскольку сайт расщепления транзитного пептида остается доступным и функционирование второго белка не изменится при добавлении этих дополнительных аминокислот по его N-концу. В качестве альтернативы специалист в данной области техники может создать точный сайт расщепления между транзитным пептидом и вторым пептидом (с его иницирующим метионином или без него) с применением синтеза генов (Stemmer, et al., (1995) *Gene* 164:49-53) или аналогичных способов. Кроме того, слияние транзитного пептида может намеренно включать аминокислоты ниже сайта расщепления. Аминокислоты на N-конце зрелого белка могут воздействовать на способность транзитного пептида нацеливать белки в плазмиды и/или эффективность расщепления после импорта белков. Это может зависеть от белка, подлежащего нацеливанию. См., например, Comai, et al., (1988) *J. Biol. Chem.* 263(29):15104-9. В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 слит с гетерологичным сигнальным пептидом или гетерологичным транзитным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены слитые белки, содержащие полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090 по настоящему изобретению, представленные формулой, вы-

бранной из группы, состоящей из R^1 -L- R^2 , R^2 -L- R^1 , R^1 - R^2 или R^2 - R^1 , где R^1 представляет собой полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090 по настоящему изобретению, и R^2 представляет собой белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 представляют собой полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090 по настоящему изобретению. Полипептид R^1 слит либо непосредственно, либо через линкерный (L) сегмент с полипептидом R^2 . Термин "непосредственно" обозначает слияния, в которых полипептиды соединены без пептидного линкера. Таким образом, "L" представляет собой химическую связь или полипептидный сегмент, с которым оба R^1 и R^2 слиты в рамке, при этом наиболее часто L представляет собой линейный пептид, с которым R^1 и R^2 связаны посредством амидных связей, связывающих карбокси-конец R^1 с амино-концом L и карбокси-конец L с амино-концом R^2 . Под "слиты в рамке" подразумевают, что между рамками считывания R^1 и R^2 отсутствует сайт терминации трансляции или разрыв. Линкерная группа (L) представляет собой обычно полипептид, составляющий от 1 до 500 аминокислот в длину. Линкеры, соединяющие две молекулы, предпочтительно конструируют так, (1) чтобы они давали возможность двум молекулам сворачиваться и действовать независимо друг от друга, (2) чтобы они не имели склонности к развитию упорядоченной вторичной структуры, которая может вступать в конфликт с функциональными доменами двух белков, (3) чтобы они имели минимальную гидрофобную или зарядную характеристику, которая может вступать в конфликт с функциональными доменами белка, и (4) чтобы они обеспечивали стерическое разделение R^1 и R^2 , так что R^1 и R^2 могли одновременно взаимодействовать со своими соответствующими рецепторами на одной клетке. Как правило, поверхностные аминокислоты в гибких участках белка включают Gly, Asn и Ser. По сути, любая перестановка аминокислотных последовательностей, содержащих Gly, Asn и Ser, как ожидается, будет удовлетворять вышеуказанным критериям для линкерной последовательности. Другие нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также можно применять в линкерной последовательности. Дополнительные аминокислоты также можно включать в линкеры, поскольку добавление уникальных сайтов рестрикции в линкерную последовательность облегчает конструирование слияний.

В некоторых вариантах осуществления линкеры содержат последовательности, выбранные из группы формул: $(Gly_3Ser)_n$, $(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_5Ser)_n$, $(Gly_nSer)_n$ или $(AlaGlySer)_n$, где n представляет собой целое число. Одним примером очень гибкого линкера является спейсерный участок, богатый (GlySer), присутствующий в белке рIII нитевидных бактериофагов, например бактериофагов M13 или fd (Schaller, et al., 1975). Этот участок обеспечивает длинный гибкий спейсерный участок между двумя доменами поверхностного белка рIII. Также включены линкеры, в состав которых входит последовательность распознавания эндопептидазы. Такой сайт расщепления может быть очень важным для отделения отдельных компонентов слияния с целью определения того, являются ли они правильным образом свернутыми и активными *in vitro*. Примеры различных эндопептидаз включают без ограничения плазмин, энтерокиназу, калликреин, урокиназу, тканевой активатор плазминогена, кластрипаин, химозин, коллагеназу, протеазу яда гадюки Рассела, фермент расщепления постпролина, протеазу V8, тромбин и фактор Ха. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислоты ЕЕКKN (SEQ ID NO: 376) из мультигенного экспрессионного "проводника" (MGEV), который расщепляется протеазами вакуолей, как раскрыто в публикации заявки на патент США № 2007/0277263. В других вариантах осуществления пептидные линкерные сегменты из шарнирного участка тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, IgD или IgE обеспечивают угловое взаимодействие между прикрепленными полипептидами. Особенно применимы являются такие шарнирные участки, в которых остатки цистеина замещены на остатки серина. Линкеры по настоящему изобретению включают последовательности, полученные из шарнирного участка IgG гамма 2b мыши, в котором остатки цистеина были заменены на остатки серина. Слитые белки не ограничиваются формой, размером или количеством используемых линкерных последовательностей, и единственное требование для линкера заключается в том, что функционально он отрицательно не влияет на фолдинг и функционирование отдельных молекул слияния.

Молекулы нуклеиновой кислоты, а также их варианты и фрагменты.

Предусмотрены выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды IPD090 или их биологически активные части, а также молекулы нуклеиновой кислоты, подходящие для применения в качестве гибридных зондов для идентификации молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белки с участками гомологии последовательностей. Используемый в данном документе термин "молекула нуклеиновой кислоты" относится к молекулам ДНК (например, рекомбинантной ДНК, κДНК, геномной ДНК, плазмидной ДНК, митохондриальной ДНК) и молекулам РНК (например, мРНК), а также к аналогам ДНК или РНК, полученным с применением аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одонитевой или двухнитевой, но предпочтительно представляет собой двухнитевую ДНК.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты (или ДНК) используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая больше не находится в своей естественной среде, например находится *in vitro*. "Рекомбинантная" молекула нуклеиновой кислоты (или ДНК) используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая находится в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления "выделенная" или "рекомбинантная" нуклеиновая кислота не содержит

последовательности (предпочтительно последовательности, кодирующие белок), которые в естественных условиях фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. Для целей настоящего изобретения термины "выделенные" или "рекомбинантные", при использовании для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, исключают выделенные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептиды IPD090, может содержать менее приблизительно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. или 0,1 т.о. из последовательностей нуклеиновой кислоты, которые в естественных условиях фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получена нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептиды IPD090, имеет одно или несколько изменений в последовательности нуклеиновой кислоты относительно нативной или геномной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изменение в нативной или геномной последовательности нуклеиновой кислоты включает без ограничения изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие вырожденности генетического кода; изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие аминокислотной замены, вставки, делеции и/или добавления по сравнению с нативной или геномной последовательностью; удаление одного или нескольких интронов; делецию одного или нескольких регуляторных участков, расположенных выше или ниже; и делецию 5'- и/или 3'-нетранслируемого участка, ассоциированного с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IPD090, представляет собой последовательность, отличную от геномной.

Предполагается ряд полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды IPD090 или родственные белки. Такие полинуклеотиды применимы для получения полипептидов IPD090 в клетках-хозяевах, если они функционально связаны с подходящим промотором, терминатором транскрипции и/или последовательностями полиаденилирования. Такие полинуклеотиды также применимы в качестве зондов для выделения гомологичных или фактически гомологичных полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды IPD090 или родственные белки.

Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды IPD090.

Одним источником полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды IPD090 или родственные белки, является бактерия рода *Pseudomonas* или *Woodsholea*, которая содержит полинуклеотид IPD090 с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 380, кодирующий полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 и SEQ ID NO: 384 соответственно. Полинуклеотиды с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 378 или SEQ ID NO: 380 можно применять для экспрессии полипептидов IPD090 в рекомбинантных бактериях-хозяевах, которые включают без ограничения бактериальные клетки-хозяева рода *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и *Rhizobium*. Полинуклеотиды также применимы в качестве зондов для выделения гомологичных или фактически гомологичных полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды IPD090 или родственные белки. Такие зонды можно применять для идентификации гомологичных или фактически гомологичных полинуклеотидов, полученных из видов рода *Pseudomonas*.

Полинуклеотиды, которые кодируют полипептиды IPD090, также можно синтезировать de novo, исходя из последовательности полипептида IPD090. Последовательность гена полинуклеотида можно вывести, исходя из последовательности полипептида IPD090, за счет применения генетического кода. Компьютерные программы, такие как "BackTranslate" (GCG™ Package, Acclerys, Inc., Сан-Диего, Калифорния), можно применять для превращения пептидной последовательности в соответствующую нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид. Примеры последовательностей полипептида IPD090, которые можно применять для получения соответствующих нуклеотидных кодирующих последовательностей, включают без ограничения полипептиды IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 и SEQ ID NO: 384. Кроме того, можно сконструировать синтетические последовательности полинуклеотида IPD090 по настоящему раскрытию таким образом, что они будут экспрессироваться в растениях.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IPD090, представляет собой полинуклеотид с последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 378 или SEQ ID NO: 380, и его варианты, фрагменты и комплементарные ему последовательности. Термин "комплементарная последовательность" используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты, которая в достаточной степени комплементарна данной последовательности нуклеиновой кислоты, так что она может гибридизоваться с данной последовательностью нуклеиновой кислоты, за счет чего образуется стабильный дуплекс. Термин "варианты полинуклеотидной последовательности" используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты, которая без учета несходства, связанного с вырожденностью генетического кода, кодирует тот же полипептид.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IPD090, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, отличную от геномной. Исполни-

зъемые в данном документе термины "последовательность нуклеиновой кислоты, отличная от геномной", или "молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной", или "полинуклеотид, отличный от геномного" относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, у которой имеется одно или несколько изменений в последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с нативной или геномной последовательностями нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изменение по отношению к нативной или геномной молекуле нуклеиновой кислоты включает без ограничения изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие вырожденности генетического кода; оптимизацию последовательности нуклеиновой кислоты для экспрессии в растениях; изменения в последовательности нуклеиновой кислоты для введения по меньшей мере одной аминокислотной замены, вставки, делеции и/или добавления по сравнению с нативной или геномной последовательностью; удаление одного или нескольких интронов, связанных с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку одного или нескольких гетерологичных интронов; делецию одного или нескольких регуляторных участков, расположенных выше или ниже, которые связаны с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; делецию 5'- и/или 3'-нетранслируемого участка, связанного с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку гетерологичного 5'- и/или 3'-нетранслируемого участка и модификацию сайта полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной, представляет собой синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IPD090, представляет собой полинуклеотид, отличный геномного, с нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 378 или SEQ ID NO: 380, где полипептид IPD090 характеризуется инсектицидной активностью.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 или больше аминокислотными заменами по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариант полипептида IPD090, содержащий любую одну или несколько аминокислотных замен, соответствующих положениям 3, 4, 8, 12, 15, 16, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 38, 46, 47, 50, 52, 55, 62, 63, 67, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 80, 90, 91, 94, 99, 100, 108, 115, 127, 129, 161, 169, 175, 177, 178, 180, 185, 207, 213, 223, 240, 241, 247, 255, 266, 273, 275, 277, 278, 287, 288, 302, 306, 309, 310, 311, 312, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 391, 392, 395, 397, 400, 401, 402, 405, 407, 410, 423, 425, 426, 431, 433, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 457, 458, 459, 460, 468, и 471 SEQ ID NO: 2 в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариант полипептида IPD090, содержащий любую одну или несколько аминокислотных замен из таблицы 10 или 12.

Также предусматриваются молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют продукты транскрипции и/или трансляции, которые в дальнейшем подвергаются сплайсингу с образованием в итоге функциональных полипептидов IPD090. Сплайсинг может осуществляться *in vitro* или *in vivo*, и он может включать цис-или транс-сплайсинг. Субстратом для сплайсинга могут быть полинуклеотиды (например, РНК-транскрипты) или полипептиды. Примером цис-сплайсинга полинуклеотида является ситуация, когда интрон, вставленный в кодирующую последовательность, удаляется и два фланкирующих экзонных участка соединяются с образованием последовательности, кодирующей полипептид IPD090. Примером транс-сплайсинга будет ситуация, когда полинуклеотид кодируется с разделением кодирующей последовательности на два или больше фрагментов, которые могут транскрибироваться отдельно, а затем соединяться с образованием пестицидной кодирующей полноразмерной последовательности. Изменение последовательности энхансера сплайсинга, которую можно вводить в конструкцию, может облегчать сплайсинг, как цис-, так и транс-сплайсинг полипептидов (патенты США № 6365377 и 6531316). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды напрямую не кодируют полноразмерный полипептид IPD090, а кодируют фрагмент или фрагменты полипептида IPD090. Эти полинуклеотиды можно применять для экспрессии функционального полипептида IPD090 посредством механизма, включающего сплайсинг, при этом сплайсинг может происходить на

уровне полинуклеотида (например, интрон/экзон) и/или полипептида (например, интеин/экстеин). Это может быть полезным, например, в контроле экспрессии пестицидной активности, поскольку функциональный пестицидный полипептид будет экспрессироваться только в том случае, если все требуемые фрагменты экспрессируются в среде, которая обеспечивает возможность процессов сплайсинга с образованием функционального продукта. В другом примере введение одной или нескольких последовательностей вставок в полинуклеотид может облегчать рекомбинацию с полинуклеотидом с низкой гомологией; при этом применение интрона или интеина в отношении последовательности вставки облегчает удаление вставочной последовательности, что восстанавливает тем самым функцию кодируемого варианта.

Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами этих последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды IPD090, также охватываются вариантами осуществления. Используемый в данном документе термин "фрагмент" относится к части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид IPD090. Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты может кодировать биологически активную часть полипептида IPD090, или он может представлять собой фрагмент, который можно применять в качестве гибридизационного зонда или ПЦР-прайма с применением способов, раскрытых ниже. Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид IPD090, содержат по меньшей мере приблизительно 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 или 360 смежных нуклеотидов или вплоть до количества нуклеотидов, присутствующих в последовательности нуклеиновой кислоты полной длины, кодирующей полипептид IPD090, раскрытый в данном документе, в зависимости от предполагаемого применения. Термин "смежные нуклеотиды" используется в данном документе для обозначения нуклеотидных остатков, которые непосредственно прилегают друг к другу. Фрагменты последовательностей нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления будут кодировать фрагменты белка, которые сохраняют биологическую активность полипептида IPD090 и, соответственно, сохраняют инсектицидную активность. Термин "сохраняет инсектицидную активность" применяют в данном документе для обозначения полипептида, обладающего по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 70, 80, 90, 95% или большей инсектицидной активностью полипептида полной длины IPD090Aa (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления инсектицидная активность направлена в отношении видов чешуекрылых. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении видов жесткокрылых. В некоторых вариантах осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении одного или нескольких насекомых-вредителей из группы кукурузного жука: западного кукурузного жука, *Diabrotica virgifera*; северного кукурузного жука, *D. barberi*; южного кукурузного жука или жука-блшки одиннадцатиточечной; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, и мексиканского кукурузного жука, *D. virgifera zeaе*. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении вида *Diabrotica*.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IPD090 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, достаточно гомологичной последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 378 или SEQ ID NO: 380. Термин "достаточно гомологичная" используется в данном документе для обозначения аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей гомологией последовательности при сравнении с эталонной последовательностью с помощью одной из программ выравнивания, описанных в данном документе, с использованием стандартных параметров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения можно соответствующим образом скорректировать для определения соответствующей гомологии белков, кодируемых двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, принимая во внимание вырожденность, аминокислотное сходство, расположение рамки считывания и т.п. В некоторых вариантах осуществления гомология последовательностей определяется в отношении последовательности полной длины полинуклеотида, кодирующего полипептид IPD090, или в отношении последовательности полной длины полипептида IPD090.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид IPD090, последовательность которого по меньшей мере на приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентична последовательности при сравнении с последовательностью с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают по всей длине полипептида с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX пакета программ Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами.

Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты осуществляют выравнивание последовательностей для целей оптимального сравнения. Процентная идентичность двух последовательностей является функцией коли-

чества идентичных положений, имеющихся в обеих последовательностях (т.е. процентная идентичность=количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений)×100). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. В другом варианте осуществления сравнение проводят по всей протяженности эталонной последовательности (например, по всей протяженности SEQ ID NO: 1). Процент идентичности двух последовательностей можно определить с применением методик, аналогичных описанным ниже, которые допускают введение гэпов или не допускают введения гэпов. При расчете процентной идентичности, как правило, подсчитывают точные совпадения.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм по Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3) :443-453, используемый в программном обеспечении GAP версии 10 для определения идентичности и сходства последовательностей с применением следующих стандартных параметров: процент идентичности и процент сходства для последовательности нуклеиновой кислоты с применением штрафа за открытие гэпа 50, и штрафа за продолжение гэпа 3, и матрицы замен `nwsgapdna.cmpii`; процент идентичности или процент сходства для аминокислотной последовательности с применением штрафа за открытие гэпа 8, и штрафа за продолжение гэпа 2, и программы замен BLOSUM62. Также можно применять эквивалентные программы. Термин "эквивалентная программа" применяется в данном документе для обозначения любой программы для сравнения последовательностей, которая для любых двух исследуемых последовательностей генерирует выравнивание с совпадениями идентичных нуклеотидных остатков и идентичной процентной идентичностью последовательности при сравнении с соответствующим выравниванием, сгенерированным с помощью GAP версии 10.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид IPD090 кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентична по всей длине аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие участки по меньшей мере двух различных полипептидов IPD090 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие участки по меньшей мере двух различных полипептидов IPD090, выбранных из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 342, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 344, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 379, и SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие N-концевой участок первого полипептида IPD090 по настоящему изобретению, функционально слитый с C-концевым участком второго полипептида IPD090 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные

полипептиды, содержащие N-концевой участок первого полипептида IPD090, функционально слитый с C-концевым участком второго полипептида IPD090, где полипептид IPD090 выбран из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 342, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 344, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 379, и SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие а) N-концевой участок, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам от 1 до приблизительно 144, аминокислотам от 1 до приблизительно 239, аминокислотам от 1 до приблизительно 296, аминокислотам от 1 до приблизительно 348, аминокислотам от 1 до приблизительно 382, аминокислотам от 1 до приблизительно 422, аминокислотам от 1 до приблизительно 442 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и б) C-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от приблизительно 146 до приблизительно 483, аминокислотам от приблизительно 241 до приблизительно 483, аминокислотам от приблизительно 297 до приблизительно 483, аминокислотам от приблизительно 349 до приблизительно 483, аминокислотам от приблизительно 383 до приблизительно 483, аминокислотам от приблизительно 423 до приблизительно 483 или аминокислотам от приблизительно 443 до приблизительно 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие а) N-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от 1 до приблизительно 144 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и б) C-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от приблизительно 146 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие а) N-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от 1 до приблизительно 239 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и б) C-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от приблизительно 241 до 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие а) N-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от 1 до приблизительно 296 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и б) C-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотным остаткам, соответствующим аминокислотам от приблизительно 297 до приблизительно 483 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие химерные полипептиды, содержащие а) N-концевой участок с по меньшей мере 90% идентичностью последова-

держащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 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 или больше аминокислотными заменами по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид IPD090 кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 аминокислотными заменами, в любой комбинации, по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид IPD090 кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 аминокислотными заменами, в любой комбинации, по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид IPD090 кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 аминокислотными заменами, в любой комбинации, по сравнению с нативной аминокислотой в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379 или SEQ ID NO: 384.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид IPD090 кодирует полипептид IPD090, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 342, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 344, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 379, и SEQ ID NO: 384.

Варианты осуществления также охватывают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты полипептида IPD090. Термин "варианты" последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид IPD090, включает последовательности, которые кодируют полипептиды IPD090, раскрытые в данном документе, но которые отличаются консервативными заменами, обусловленными вырожденностью генетического кода, а также последовательности, которые являются достаточно идентичными, как обсуждалось выше. Встречающиеся в природе аллельные варианты можно идентифицировать с применением хорошо известных методик молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методики гибридизации, изложенные ниже. Вариантные последовательности нуклеиновой кислоты также включают синтетически полученные последовательности нуклеиновой кислоты, которые

были получены, например, с применением сайт-направленного мутагенеза, но которые по-прежнему кодируют раскрытые полипептиды IPD090, обсуждаемые ниже.

Настоящее изобретение предусматривает выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды, которые кодируют любые из полипептидов IPD090, раскрытых в данном документе. Специалисты обычной квалификации в данной области легко поймут, что вследствие вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды IPD090 по настоящему изобретению.

Также специалисту в данной области техники будет понятно, что изменения можно вводить путем мутирования последовательностей нуклеиновой кислоты, что ведет к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых полипептидов IPD090 без изменения биологической активности белков. Таким образом, варианты молекулы нуклеиновой кислоты можно создавать путем введения одной или нескольких нуклеотидных замен, добавлений и/или делеций в соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, так что одна или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций вводятся в кодируемый белок. Мутации можно вводить с помощью стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты последовательности нуклеиновой кислоты также охватываются настоящим изобретением.

В качестве альтернативы варианты последовательности нуклеиновой кислоты можно получать путем введения мутаций случайным образом по всей или части кодирующей последовательности, как, например, путем сайт-насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты можно подвергать скринингу в отношении способности обеспечивать пестицидную активность для идентификации мутантов, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать рекомбинантным способом, и активность белка можно определять с применением стандартных методик анализа.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению и их фрагменты необязательно применяют в качестве субстратов для ряда реакций рекомбинации и рекуррентной рекомбинации, в дополнение к стандартным способам клонирования, изложенным, например, в Ausubel, Berger и Sambrook, т.е. для получения дополнительных гомологов пестицидных полипептидов и их фрагментов с требуемыми свойствами. Известен ряд таких реакций, в том числе разработанные авторами настоящего изобретения и их сотрудниками. Способы получения варианта любой нуклеиновой кислоты, приведенной в данном документе, предусматривают рекуррентную рекомбинацию такого полинуклеотида со вторым (или большим количеством) полинуклеотидом, таким образом, получение библиотеки вариантов полинуклеотидов также представляет собой варианты осуществления по настоящему изобретению, так же как и полученные библиотеки, клетки, содержащие библиотеки и любой рекомбинантный полинуклеотид, полученный такими способами. Дополнительно такие способы необязательно предусматривают отбор вариантного полинуклеотида из таких библиотек на основе пестицидной активности, как есть, где такую рекуррентную рекомбинацию осуществляют *in vitro* или *in vivo*.

Ряд протоколов создания разнообразия, в том числе протоколы рекуррентной рекомбинации нуклеиновых кислот, доступен и полностью описан в уровне техники. Для получения одного или нескольких вариантов нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, а также вариантов кодируемых белков, процедуры можно применять отдельно и/или в комбинации. По отдельности и вместе эти процедуры обеспечивают надежные, широко применяемые способы создания диверсифицированных нуклеиновых кислот и наборов нуклеиновых кислот (в том числе, например, библиотек нуклеиновых кислот), применимых, например, для конструирования или быстрой эволюции нуклеиновых кислот, белков, метаболических путей, клеток и/или организмов с новыми и/или улучшенными характеристиками.

Хотя в ходе следующего обсуждения для ясности делают разграничение и классификацию, будет принято во внимание, что методики часто не являются взаимоисключающими. Более того, различные способы можно применять по отдельности или в комбинации, одновременно или последовательно, для получения доступа к различным вариантам последовательностей.

Результатом любой из процедур создания разнообразия, описанных в данном документе, может быть создание одной или нескольких нуклеиновых кислот, которые можно подвергнуть отбору или скринингу в отношении нуклеиновых кислот, имеющих требуемые свойства или обеспечивающих их, или нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, имеющие требуемые свойства или обеспечивающие их. После диверсификации с помощью одного или нескольких способов, описанных в данном документе или иным образом доступных специалисту в данной области, любые получаемые нуклеиновые кислоты можно подвергать отбору в отношении требуемой активности или свойства, например, пестицидной активности или такой активности при требуемом значении pH и т.д. Это может включать идентификацию любой активности, которую можно выявить, например, в автоматизированном или автоматизируемом формате, посредством любого из анализов, известных в данной области, см., например, ниже обсуждение проведения скрининга в отношении инсектицидной активности. Можно оценивать ряд связанных (или даже несвязанных) свойств последовательно или одновременно, на усмотрение специалиста-практика.

Описания ряда процедур создания разнообразия с целью создания модифицированных последовательностей нуклеиновой кислоты, например последовательностей, кодирующих полипептиды с пестицидной активностью или их фрагменты, находятся в следующих публикациях и литературных ссылках,

приведенных в них: Soong, et al., (2000) *Nat Genet* 25(4):436-439; Sterner, et al., (1999) *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:893-896; Chang, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:793-797; Minshull and Stemmer, (1999) *Curr Opin Chem Biol* 3:284-290; Christians, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:259-264; Cramer, et al., (1998) *Nature* 391:288-291; Cramer, et al., (1997) *Nat Biotechnol* 15:436-438; Zhang, et al., (1997) *PNAS USA* 94:4504-4509; Patten, et al., (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:724-733; Cramer, et al., (1996) *Nat Med* 2:100-103; Cramer, et al., (1996) *Nat Biotechnol* 14:315-319; Gates, et al., (1996) *J Mol Biol* 255:373-386; Stemmer, (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" в *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp. 447-457; Cramer and Stemmer, (1995) *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer, et al., (1995) *Gene*, 164:49-53; Stemmer, (1995) *Science* 270: 1510; Stemmer, (1995) *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer, (1994) *Nature* 370:389-391 и Stemmer, (1994) *PNAS USA* 91:10747-10751.

Мутационные способы создания разнообразия включают, например, сайт-направленный мутагенез (Ling, et al., (1997) *Anal Biochem* 254 (2):157-178; Dale, et al., (1996) *Methods Mol Biol* 57:369-374; Smith, (1985) *All Rev Genet* 19:423-462; Botstein and Shortle, (1985) *Science* 229:1193-1201; Carter, (1986) *Biochem J* 237:1-7 и Kunkel, (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" в *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein and Lilley, eds., Springer Verlag, Berlin)); мутагенез с применением урацил-содержащих матриц (Kunkel, (1985) *PNAS USA* 82:488-492; Kunkel, et al., (1987) *Methods Enzymol* 154:367-382 и Bass, et al., (1988) *Science* 242:240-245); олигонуклеотид-направленный мутагенез (Zoller and Smith, (1983) *Methods Enzymol* 100:468-500; Zoller and Smith, (1987) *Methods Enzymol* 154:329-350 (1987); Zoller and Smith, (1982) *Nucleic Acids Res* 10:6487-6500), мутагенез фосфоротиоат-модифицированной ДНК (Taylor, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:8749-8764; Taylor, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:8765-8787 (1985); Nakamaye and Eckstein, (1986) *Nucl Acids Res* 14:9679-9698; Sayers, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:791-802 и Sayers, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:803-814); мутагенез с применением дуплексной ДНК с гэпом (Kramer, et al., (1984) *Nucl Acids Res* 12:9441-9456; Kramer and Fritz, (1987) *Methods Enzymol* 154:350-367; Kramer, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:7207 и Fritz, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:6987-6999).

Дополнительные подходящие способы включают точечную репарацию ошибочно спаренных оснований (Kramer, et al., (1984) *Cell* 38:879-887), мутагенез с применением штаммов-хозяев с недостаточностью репарации (Carter, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:4431-4443 и Carter, (1987) *Methods in Enzymol* 154:382-403), делеционный мутагенез (Eghtedarzadeh and Henikoff, (1986) *Nucl Acids Res* 14:5115), рестриктию-отбор и рестриктию-очистку (Wells, et al., (1986) *Phil Trans R Soc Lond A* 317:415-423), мутагенез посредством полного синтеза гена (Nambiar, et al., (1984) *Science* 223:1299-1301; Sakamar and Khorana, (1988) *Nucl Acids Res* 14:6361-6372; Wells, et al., (1985) *Gene* 34:315-323 и Grundstrom, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:3305-3316), репарацию двухнитевых разрывов (Mandecki, (1986) *PNAS USA*, 83:7177-7181 и Arnold, (1993) *Curr Opin Biotech* 4:450-455). Дополнительные сведения по многим из вышеуказанных способов можно найти в *Methods Enzymol*, том 154, в котором также описаны полезные руководства по поиску и устранению проблем в случае различных способов мутагенеза.

Дополнительные подробности, касающиеся различных способов создания разнообразия, можно найти в следующих патентах США, публикациях и заявках согласно РСТ и публикациях ЕРО: в патенте США № 5723323, патенте США № 5763192, патенте США № 5814476, патенте США № 5817483, патенте США № 5824514, патенте США № 5976862, патенте США № 5605793, патенте США № 5811238, патенте США № 5830721, патенте США № 5834252, патенте США № 5837458, WO 1995/22625, WO 1996/33207, WO 1997/20078, WO 1997/35966, WO 1999/41402, WO 1999/41383, WO 1999/41369, WO 1999/41368, EP 752008, EP 0932670, WO 1999/23107, WO 1999/21979, WO 1998/31837, WO 1998/27230, WO 1998/27230, WO 2000/00632, WO 2000/09679, WO 1998/42832, WO 1999/29902, WO 1998/41653, WO 1998/41622, WO 1998/42727, WO 2000/18906, WO 2000/04190, WO 2000/42561, WO 2000/42559, WO 2000/42560, WO 2001/23401 и РСТ/US01/06775.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления также можно применять для выделения соответствующих последовательностей из бактериального источника, в том числе без ограничения видов рода *Pseudomonas*. Таким образом, такие способы как ПЦР, гибридизация и т.п. можно применять для идентификации таких последовательностей на основе гомологии их последовательности с последовательностями, изложенными в данном документе. Вариантами осуществления охватываются последовательности, выбранные на основе идентичности их последовательности полным последовательностям, изложенным в данном документе, или их фрагментам. Такие последовательности включают в себя последовательности, которые являются ортологами раскрытых последовательностей. Термин "ортологи" относится к генам, происходящим от общего предкового гена и выявляемым у различных видов вследствие видообразования. Гены, обнаруживаемые у различных видов, считаются ортологами в том случае, если их нуклеотидные последовательности и/или кодируемые ими белковые последовательности имеют существенную степень идентичности, как определено в других разделах данного документа. Функции ортологов зачастую являются высококонсервативными среди видов.

В случае подхода, основанного на ПЦР, олигонуклеотидные праймеры можно сконструировать для применения в ПЦР-реакциях для амплификации соответствующих последовательностей ДНК, исходя из кДНК или геномной ДНК, извлеченных из какого-либо организма, представляющего интерес. Способы

конструирования ПЦР-праймеров и ПЦР-клонирования, как правило, известны из уровня техники и раскрыты в Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), в дальнейшем "Sambrook". См. также Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); и Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Известные способы ПЦР включают без ограничения способы с применением парных праймеров, гнездовых праймеров, одиночных специфичных праймеров, вырожденных праймеров, ген-специфичных праймеров, вектор-специфичных праймеров, частично ошибочно спаренных праймеров и т.п.

Для идентификации потенциальных полипептидов IPD090 из коллекций бактерий лизаты клеток можно подвергать скринингу с применением антител, вырабатываемых в отношении полипептидов IPD090 и/или полипептидов IPD090 с применением способов вестерн-блоттинга и/или ELISA. Этот тип анализов можно выполнять высокопроизводительным способом. Положительные образцы можно дополнительно анализировать с помощью различных методик, таких как очистка и идентификация белков с помощью антител. Способы получения антител хорошо известны в данной области, как обсуждается ниже.

В качестве альтернативы для идентификации гомологов полипептидов IPD090 можно применять способ идентификации белков на основе масс-спектрометрии с применением протоколов из литературных источников (Scott Patterson, (1998), 10.22, 1-24, *Current Protocol in Molecular Biology*, опубликованный John Wiley & Son Inc). В частности, способ идентификации белков на основе LC-MS/MS применяют для установления связи MS-данных указанных клеточных лизатов или образцов, обогащенных молекулами с требуемой молекулярной массой (вырезанных из геля SDS-PAGE с полосками с молекулярной массой, соответствующей полипептидам IPD090), с информацией о последовательности полипептидов IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 28 и их гомологов. Любое совпадение в пептидных последовательностях указывает на возможность наличия гомологичных белков в образцах. Дополнительные методики (очистки белка и методики молекулярной биологии) можно применять для выделения белка и идентификации последовательностей гомологов.

В способах гибридизации для скрининга кДНК или геномных библиотек можно применять всю или часть последовательности пестицидной нуклеиновой кислоты. Способы для конструирования таких кДНК и геномных библиотек, как правило, известны из уровня техники и раскрыты в Sambrook и Russell, (2001), выше. Так называемые гибридизационные зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и они могут быть помечены выявляемой группой, такой как 32P, или любым другим детектируемым маркером, таким как другие радиоактивные изотопы, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации можно создавать путем мечения синтетических олигонуклеотидов, основанных на известной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид IPD090, раскрытой в данном документе. Дополнительно можно применять вырожденные праймеры, сконструированные на основе консервативных нуклеотидных или аминокислотных остатков в последовательности нуклеиновой кислоты или кодируемой аминокислотной последовательности. Как правило, зонд содержит участок последовательности нуклеиновой кислоты, который гибридизируется при жестких условиях по меньшей мере с приблизительно 12, по меньшей мере с приблизительно 25, по меньшей мере с приблизительно 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 последовательными нуклеотидами последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид IPD090 по настоящему изобретению или его фрагмент или вариант. Способы получения зондов для гибридизации, как правило, известны из уровня техники и раскрыты в Sambrook and Russell, (2001), выше, включенном в данный документ посредством ссылки.

Например, полную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид IPD090, раскрытую в данном документе, или одну или несколько ее частей можно применять в качестве зонда, способного специфично гибридизоваться с соответствующими последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими последовательности, подобные полипептиду IPD090, и матричными РНК. Для достижения специфичной гибридизации при различных условиях такие зонды включают в себя последовательности, которые являются уникальными и предпочтительно состоят по меньшей мере из приблизительно 10 нуклеотидов в длину или по меньшей мере из приблизительно 20 нуклеотидов в длину. Такие зонды можно применять для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма с помощью ПЦР. Эту методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического анализа для определения присутствия кодирующих последовательностей в организме. Методики гибридизации включают гибридизационный скрининг высевных ДНК-библиотек (либо бляшек, либо колоний; см., например, Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Гибридизацию таких последовательностей можно проводить в жестких условиях. Термины "жест-

кие условия" или "жесткие условия гибридизации" применяются в данном документе для обозначения условий, при которых зонд будет гибридизироваться со своей целевой последовательностью в явно большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза больше по сравнению с фоновой последовательностью). Жесткие условия являются зависимыми от последовательности и будут отличаться при различных обстоятельствах. Путем контроля жесткости условий гибридизации и/или отмывки можно идентифицировать целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гибридизация с гомологичным зондом). В качестве альтернативы условия жесткости можно скорректировать для обеспечения некоторого ошибочного спаривания в последовательностях с тем, чтобы выявлять более низкие степени сходства (гибридизация с гетерологичным зондом). В целом зонд составляет менее приблизительно 1000 нуклеотидов в длину, предпочтительно менее 500 нуклеотидов в длину.

Композиции.

Также охвачены композиции, содержащие по меньшей мере один полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090 по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления композиция содержит полипептид IPD090 по настоящему изобретению и приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции, содержащей полипептид IPD090 по настоящему изобретению и штамм энтомопатогенного гриба, выбранного из *Metarhizium robertsii* и *Metarhizium anisopliae*. В определенных вариантах осуществления грибковый энтомопатоген представляет собой споры, микросклероций или конидию. В некоторых вариантах осуществления грибковый энтомопатоген характеризуется инсектицидной активностью.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции для повышения устойчивости к вредителю, патогену или насекомому-вредителю растения, или для улучшения здоровья и/или урожайности растения, содержащей полипептид IPD090 по настоящему изобретению и один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) или любой их комбинации. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полипептид IPD090 по настоящему изобретению, приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их комбинации. В дополнительном варианте осуществления грибковый энтомопатоген представляет собой споры, конидию или микросклероций. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полипептид IPD090 по настоящему изобретению и один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074), мутантов этих штаммов, метаболита или комбинации метаболитов, продуцируемых штаммом, раскрытым в данном документе, который характеризуется инсектицидной активностью в отношении растительного вредителя, патогена или насекомого, или любой их комбинации.

Антитела.

Также охвачены антитела к полипептиду IPD090 согласно вариантам осуществления или к его вариантам или фрагментам. Антитела по настоящему изобретению включают поликлональные и моноклональные антитела, а также их фрагменты, которые сохраняют свою способность связываться с полипептидом IPD090, обнаруженным в кишечнике насекомого. Полагают, что антитело, моноклональное антитело или его фрагмент способны связывать молекулу, если они способны специфично реагировать с молекулой, связывая, тем самым, молекулу с антителом, моноклональным антителом или его фрагментом. Как подразумевается, термин "антитело" (Ab) или "моноклональное антитело" (Mab) включает интактные молекулы, а также их фрагменты, или связывающие участки, или домены (такие как, например, фрагменты Fab и F(ab)₂), которые способны связывать гаптен. Как правило, такие фрагменты получают с помощью протеолитического расщепления, например с помощью папаина или пепсина. В качестве альтернативы гаптен-связывающие фрагменты можно получать посредством применения технологии рекомбинантной ДНК или с помощью синтетической химии. Как правило, способы получения антител по настоящему раскрытию изобретению из уровня техники. Например, см. *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988), а также приводимые в нем литературные источники. Стандартные справочные работы, излагающие общие принципы иммунологии, включают Klein, J. *Immunology: The Science of Cell-Noncell Discrimination*, John Wiley & Sons, N.Y. (1982); Dennett, et al., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, N.Y. (1980) и Campbell, "Monoclonal Antibody Technology," в *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burdon, et al., (eds.), Elsevier, Amsterdam (1984). См. также патенты США № 4196265; 4609893; 4713325; 4714681; 4716111; 4716117 и 4720459. Антитела к полипептидам IPD090 или их антиген-связывающие части можно получать с помощью ряда методик, в том числе традиционных методик получения моноклональных антител, например стандартной методики гибридизации соматических клеток согласно Kohler and Milstein, (1975) *Nature* 256:495. Также можно использовать другие

методики получения моноклонального антитела, такие как вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов. Система на основе животного для получения гибридом представляет собой систему на основе мыши. В данной области известны протоколы иммунизации и методики выделения спленоцитов иммунизированных животных для слияния. Также известны партнеры слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния. Антитело и моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получить путем использования полипептида IPD090 в качестве антигенов.

Предусмотрен набор для выявления присутствия полипептида IPD090 или выявления присутствия нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид IPD090, в образце. В одном варианте осуществления в наборе имеются реагенты на основе антитела для выявления присутствия полипептида IPD090 в образце ткани. В другом варианте осуществления в наборе имеются меченые зонды на основе нуклеиновой кислоты, применяемые для выявления присутствия одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих полипептид IPD090. В наборе также имеются соответствующие реагенты и контрольные образцы для проведения способа выявления, а также инструкции для применения набора.

Идентификация и выделение рецептора.

Также охвачены рецепторы к полипептиду IPD090 согласно вариантам осуществления или к его вариантам или фрагментам. Способы идентификации рецепторов, хорошо известные из уровня техники (см. Hofmann, et al., (1988) Eur. J. Biochem. 173:85-91; Gill, et al., (1995) J. Biol. Chem. 27277-27282), можно использовать для идентификации и выделения рецептора, который распознает полипептид IPD090, с применением мембранных везикул щеточной каемки от восприимчивых насекомых. В дополнение к способу радиоактивного мечения, приведенному в упомянутых источниках, полипептид IPD090 можно метить с помощью флуоресцентного красителя и других стандартных меток, таких как стрептавидин. Мембранные пузырьки из щеточной каемки (BBMV) восприимчивых насекомых, таких как соевая совка и щитники, можно получать в соответствии с протоколами, приведенными в ссылочных документах, и разделять на геле SDS-PAGE, а также переносить на подходящую мембрану. Меченый полипептид IPD090 можно инкубировать с мембраной, на которой находятся подвергнутые блоттингу BBMV, и при этом меченный полипептид IPD090 можно идентифицировать с помощью меченых репортеров. Идентификацию полосы(полос) белка(белков), которые взаимодействуют с полипептидом IPD090, можно проводить с помощью секвенирования N-концевых аминокислотных остатков в газовой фазе или способа идентификации белков на основе масс-спектрометрии (Patterson, (1998) 10.22, 1-24, Current Protocol in Molecular Biology, опубликованный John Wiley & Son Inc). После идентификации белка соответствующий ген можно клонировать из библиотеки геномной ДНК или кДНК восприимчивых насекомых, и аффинность связывания можно оценивать непосредственно с помощью полипептида IPD090. Рецепторную функцию в осуществлении инсектицидной активности полипептида IPD090 можно подтвердить путем осуществления способа нокаута гена с помощью RNAi (Rajagopal, et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:46849-46851).

Нуклеотидные конструкции, кассеты и векторы экспрессии.

Использование термина "нуклеотидные конструкции" в данном документе не предназначено ограничивать варианты осуществления нуклеотидными конструкциями, содержащими ДНК. Специалистам в данной области будет понятно, что нуклеотидные конструкции, в частности полинуклеотиды и олигонуклеотиды, состоящие из рибонуклеотидов и комбинаций рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, также можно использовать в способах, раскрытых в данном документе. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления дополнительно охватывают все комплементарные формы таких конструкций, молекул и последовательностей. Кроме того, нуклеотидные конструкции, нуклеотидные молекулы и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления охватывают все нуклеотидные конструкции, молекулы и последовательности, которые можно использовать в способах согласно вариантам осуществления для трансформации растений, в том числе без ограничения состоящие из дезоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидов и их комбинаций. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды имеют в составе как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления также охватывают все формы нуклеотидных конструкций, в том числе без ограничения одонитевые формы, двухнитевые формы, шпильки, структуры типа "стебель-и-петля" и т.п.

Дополнительный вариант осуществления относится к трансформированному организму, такому как организм, выбранный из растительных клеток или клеток насекомых, бактерий, дрожжей, бакуловируса, простейших, нематод и водорослей.

Трансформированный организм содержит молекулу ДНК согласно вариантам осуществления, кассету экспрессии, содержащую молекулу ДНК, или вектор, содержащий кассету экспрессии, которые могут быть стабильно встроенными в геном трансформированного организма.

Последовательности согласно вариантам осуществления предусматриваются в составе ДНК-конструкций для экспрессии в организме, представляющем интерес. Конструкции будут включать 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью согласно вариантам осуществления. Термин "функционально связанный", используемый в данном документе, относится

к функциональной связи между промотором и второй последовательностью, где последовательность промотора инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Как правило, функционально связанный означает, что связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются смежными, и при необходимости соединяют два кодирующих белок участка в одной рамке считывания. Конструкция может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, подлежащий введению в организм путем котрансформации. В качестве альтернативы дополнительный(дополнительные) ген(гены) могут предусматриваться в нескольких ДНК-конструкциях.

Такая ДНК-конструкция снабжена несколькими сайтами рестрикции для вставки последовательности гена, кодирующего полипептид IPD090 по настоящему изобретению, транскрипция которой будет регулироваться регуляторными участками. ДНК-конструкция может дополнительно содержать селективируемые маркерные гены.

Как правило, в направлении транскрипции от 5' к 3' концу ДНК-конструкция будет включать: участок инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), последовательность ДНК согласно вариантам осуществления и участок терминации транскрипции и трансляции (т.е. участок терминации), функционирующие в организме, служащем хозяином. Участок инициации транскрипции (т. е. промотор) может быть нативным, аналогичным, чужеродным или гетерологичным относительно организма-хозяина и/или последовательности согласно вариантам осуществления. Кроме того, промотор может представлять собой природную последовательность или в качестве альтернативы синтетическую последовательность. Термин "чужеродный", используемый в данном документе, указывает на то, что промотор не найден в нативном организме, в который введен промотор. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" относительно последовательности согласно вариантам осуществления, то предполагается, что промотор не является нативным или встречающимся в природе промотором для функционально связанной последовательности согласно вариантам осуществления. Химерный ген, как используется в данном документе, содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с участком инициации транскрипции, который является гетерологичным для кодирующей последовательности. Если промотор представляет собой нативную или природную последовательность, то экспрессия функционально связанной последовательности изменена по сравнению с экспрессией дикого типа, что приводит к изменению фенотипа.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид IPD090 согласно вариантам осуществления.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, кодирующий химерный полипептид IPD090 согласно вариантам осуществления.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий полипептид IPD090 согласно вариантам осуществления.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, содержащий первую кодирующую последовательность, кодирующую N-концевой участок первого полипептида IPD090 по настоящему изобретению, и вторую кодирующую последовательность, кодирующую C-концевой участок второго полипептида IPD090 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид с SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387 или SEQ ID NO: 388. В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382 или SEQ ID NO: 383.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция может также включать последовательность транскрипционного энхансера. Используемый в данном документе термин "энхансер" относится к последовательности ДНК, которая может стимулировать активность промотора и которая может представлять собой характерный элемент промотора или гетерологичный элемент, вставленный для повышения уровня активности или тканевой специфичности промотора. Из уровня техники известны различные энхансеры, например, также могут применяться интроны со свойствами улучшения генной экспрессии в растениях (публикация заявки на патент США № 2009/0144863, интрон убиквитина (т.е. интрон 1 убиквитина маиса (см., например, последовательность NCBI S94464)), омега-энхансер или омега-штрих-энхансер (Gallie, et al., (1989) *Molecular Biology of RNA* ed. Cech (Liss, New York) 237-256 и Gallie, et al., (1987) *Gene* 60:217-25), энхансер CaMV 35S (см., например, Benfey, et al., (1990) *EMBO J.* 9:1685-96) и энхансеры из патента США № 7803992, каждый из которых включен посредством ссылки. В патенте США № US8785612 раскрыт транскрипционный энхансер палочковидного баднавируса сахарного тростника (SCBV).

Вышеприведенный перечень транскрипционных энхансеров не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой подходящий транскрипционный энхансер.

Участок терминации может быть нативным относительно участка инициации транскрипции, может быть нативным относительно функционально связанной последовательности ДНК, представляющей интерес, может быть нативным относительно растения-хозяина или может быть получен из другого источника (т.е. чужеродный или гетерологичный для промотора, последовательности, представляющей интерес, растения-хозяина или какой-либо их комбинации).

Подходящие участки терминации доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как участки терминации генов октопинсинтазы и нопалинсинтазы. См. также Guerinéau, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot, (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfaçon, et al., (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen, et al., (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe, et al., (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903 и Joshi, et al., (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639. Другие пригодные терминаторы транскрипции для экспрессии трансгенов в растениях включают терминаторы транскрипции MYB2, KTI1, PIP1, EF1A2 и MTH1 из US8741634.

При необходимости, нуклеиновую кислоту можно оптимизировать для усиления экспрессии в организме-хозяине. Таким образом, если организм-хозяин является растением, то для усиления экспрессии можно синтезировать синтетические нуклеиновые кислоты с применением кодонов, предпочтительных для растений. См., например, Campbell and Gowri, (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11, где обсуждается применение предпочтительного для хозяина. Например, хотя последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления могут экспрессироваться у видов как однодольных, так и двудольных растений, последовательности можно модифицировать с учетом специфических предпочтений и предпочтений по содержанию GC у однодольных или двудольных, если было показано, что предпочтения отличаются (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Таким образом, предпочтительный для маиса для конкретной аминокислоты можно получить из известных последовательностей генов маиса. Данные о применении маиса для 28 генов из растений маиса приведены в табл. 4 из Murray, et al., упомянутого выше. Из уровня техники доступны способы синтеза генов, предпочтительных для растений. См., например, Murray, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498 и Liu H et al. *Mol Bio Rep* 37:677-684, 2010, включенные в данный документ посредством ссылки. Таблицу применениями *maize* также можно найти на веб-сайте по адресу kazusa.или.jp/cgi-bin/show.cgi?species=4577, доступ к которому можно получить с применением приставки *www*.

Таблицу применения *Glycine max* можно найти на веб-сайте по адресу kazusa.или.jp/cgi-bin/show.cgi?species=3847&aa=l&style=N, доступ к которому можно получить с применением приставки *www*.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IPD090, имеет кодоны, оптимизированные для маиса.

Известны дополнительные модификации последовательности для усиления экспрессии гена у клеточного хозяина. Они включают устранение последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналы сайта сплайсинга экзонов и интронов, транспозон-подобные повторы и другие хорошо изученные последовательности, которые могут быть вредны для экспрессии гена. Содержание GC в последовательности можно скорректировать до уровней, средних для данного клеточного хозяина, рассчитываемых с учетом известных генов, экспрессируемых в клетке-хозяине. Термин "клетка-хозяин", используемый в данном документе, относится к клетке, которая содержит вектор и которая поддерживает репликацию и/или экспрессию предполагаемых векторов экспрессии. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками, такими как *E. coli*, или эукариотическими клетками, такими как клетки дрожжей, насекомых, амфибий или млекопитающих, или клетками однодольных или двудольных растений. Примером клетки-хозяина, относящейся к однодольному растению, является клетка-хозяин маиса. Если это возможно, то последовательность модифицируют для того, чтобы избежать образования прогнозируемых шпилечных вторичных структур мРНК.

Кассеты экспрессии могут дополнительно содержать 5'-лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут способствовать усилению трансляции. Лидерные последовательности трансляции известны из уровня техники и предусматривают лидерные последовательности пикорнавирусов, например лидерную последовательность EMCV (5'-некодирующий участок вируса энцефаломиокардита) (Elroy-Stein, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); лидерные последовательности потивирусов, например лидерную последовательность TEV (вируса гравировки табака) (Gallie, et al., (1995) *Gene* 165(2):233-238), лидерную последовательность MDMV (вируса карликовой мозаики кукурузы), последовательность белка, связывающего тяжелую цепь иммуноглобулина человека (BiP) (Masejak, et al., (1991) *Nature* 353:90-94); нетранслируемую лидерную последовательность из мРНК белка оболочки вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling, et al., (1987) *Nature* 325:622-625); лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie, et al., (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256) и лидерную последовательность вируса хлорозной мозаики маиса (MCMV) (Lommel, et al., (1991) *Virology* 81:382-385). См. также Delia Cioppa et al. (1987) *Plant Physiology* 84:965-968. Такие конструкции могут также содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность" для облегчения сопряженного с трансляцией или посттрансляционного транспорта пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

Термин "сигнальная последовательность", используемый в данном документе, относится к последовательности, которая, как известно или как ожидается, приводит к сопряженному с трансляцией или посттрансляционному транспорту пептида через клеточную мембрану. У эукариот это обычно подразумевает секрецию в пузырьках аппарата Гольджи, при этом происходит гликолизирование до некоторой

степени. Инсектицидные токсины бактерий зачастую синтезируются в виде протоксинов, которые активируются под действием протеолиза в кишечнике целевого вредителя (Chang, (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность расположена в нативной последовательности или может быть получена из последовательности согласно вариантам осуществления. Термин "лидерная последовательность", используемый в данном документе, относится к любой последовательности, которая при трансляции приводит к аминокислотной последовательности, способной запускать сопряженный с трансляцией транспорт пептидной цепи во внутриклеточную органеллу. Таким образом, это предусматривает лидерные последовательности, целенаправленно воздействующие на транспорт и/или гликозилирование посредством перехода в эндоплазматический ретикулум, перехода в вакуоли, пластиды, в том числе хлоропласты, митохондрии и т.п. Кодированные в ядре белки, нацеленные в компартмент полости тилакоида хлоропластов, имеют характерный двойной транзитный пептид, состоящий из сигнального пептида, нацеливающего на строму, и сигнального пептида, нацеливающего на полость. Информация для нацеливания на строму находится в ближайшей к аминоконцу части транзитного пептида. Сигнальный пептид, нацеливающий на полость, находится в ближайшей к карбокси-концу части транзитного пептида и содержит всю информацию для нацеливания на полость. Последние исследования по протеомике хлоропластов высших растений добились успеха в идентификации многочисленных кодируемых в ядре белков полости (Kieselbach et al. *FEBS LETT* 480:271-276, 2000; Peltier et al. *Plant Cell* 12:319-341, 2000; Bricker et al. *Biochim. Biophys Acta* 1503:350-356, 2001), при этом их сигнальный пептид, нацеливающий на полость, можно потенциально применять в соответствии с настоящим изобретением. О приблизительно 80 белках из *Arabidopsis*, а также гомологичных белках из шпината и гороха огородного, сообщается в Kieselbach et al., *Photosynthesis Research*, 78:249-264, 2003. В частности, в табл. 2 данной публикации, которая включена в настоящее описание посредством ссылки, раскрыто 85 белков из полости хлоропласта, идентифицированных по их номеру доступа (см. также публикацию заявки на патент США № 2009/09044298). Кроме того, опубликованная недавно предварительная версия генома риса (Goff et al, *Science* 296:92-100, 2002) является подходящим источником для информации о сигнальном пептиде, нацеливающем на полость, который можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

Подходящие транзитные пептиды хлоропластов (СТР), хорошо известные специалисту в данной области техники, также включают химерные СТ, содержащие без ограничения N-концевой домен, центральный домен или C-концевой домен СТР из 1-дезоксид-Д-ксилоза-5-фосфатсинтазы *Oryza sativa*, супероксиддисмутазы *Oryza sativa*, синтазы растворимого крахмала *Oryza sativa*, NADP-зависимого фермента, действующего на яблочную кислоту, *Oryza sativa*, фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатаьдолазы 2 *Oryza sativa*, L-аскорбатпероксидазы 5 *Oryza sativa*, фосфоглюкан-вода-дикиназы *Oryza sativa*, ssRUBISCO *Zea Mays*, бета-глюкозидазы *Zea Mays*, малатдегидрогеназы *Zea Mays*, тиоредоксина M-типа *Zea Mays* (патент США 9150625); транзитного пептида хлоропластов из публикации заявки на патент США № US20130210114.

Ген полипептида IPD090, подлежащего нацеливанию в хлоропласт, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте с учетом отличий по использованию между растительным ядром и этой органеллой. Таким образом, нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, можно синтезировать с применением последовательностей, предпочтительных для хлоропласта.

При получении кассеты экспрессии с различными фрагментами ДНК можно проводить манипуляции так, чтобы получить последовательности ДНК в надлежащей ориентации и, при необходимости, в надлежащей рамке считывания. С данной целью для соединения фрагментов ДНК можно использовать адаптеры или линкеры или можно задействовать другие манипуляции для обеспечения подходящих сайтов рестрикции, удаления избыточной ДНК, удаления сайтов рестрикции и т.п. С данной целью можно задействовать мутагенез *in vitro*, репарацию с помощью праймеров, рестрикцию, гибридизацию, повторные замены, например транзиции и трансверсии.

При практическом осуществлении вариантов осуществления можно применять ряд промоторов. Промоторы можно выбирать, исходя из необходимого результата. Нуклеиновые кислоты можно комбинировать с конститутивными, предпочтительными для ткани, индуцируемыми или другими промоторами для экспрессии в организме-хозяине. Подходящие конститутивные промоторы для применения в растительной клетке-хозяине включают, например, основной промотор промотора Rsyn7 и других конститутивных промоторов, раскрытых в WO 1999/43838 и патенте США № 6072050; основной промотор 35S CaMV (Odell, et al., (1985) *Nature* 313:810-812); промотор актина риса (McElroy, et al., (1990) *Plant Cell* 2:163-171); убиквитиновый промотор (Christensen, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 и Christensen, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last, et al., (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730), US8168859, US8420797; группу убиквитиновых транскрипционных регуляторных элементов и транскрипционных регуляторных элементов экспрессии, раскрытую в US9062316; промотор ALS (патент США № 5659026) и т.п. Конститутивный промотор сои ADF1 раскрыт в публикации заявки на патент США US20150184174. Конститутивный промотор сои CCP1 раскрыт в публикации заявки на патент США US20150167011. Другие конститутивные промоторы включают, например, раскрытые в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680;

5268463; 5608142 и 6177611. Участки инициации транскрипции, выделенные из вируса красной кольцевой пятнистости черники (BRRV), раскрыты в патенте США US8895716. Участки инициации транскрипции, выделенные из вируса деформации побегов какао (CSSV), раскрыты в патенте США US8962916.

В зависимости от требуемого результата, может быть полезно экспрессировать ген с помощью индуцируемого промотора. Особый интерес для регуляции экспрессии нуклеотидных последовательностей согласно вариантам осуществления у растений представляют собой индуцируемые ранением промоторы. Такие индуцируемые ранением промоторы могут реагировать на повреждение, вызванное питанием насекомого, и они включают промотор гена ингибитора протеиназы (pin II) картофеля (Ryan, (1990) *Алл. Rev. Phytopath.* 28:425-449; Duan, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:494-498); *wun1* и *wun2*, патент США № 5428148; *win1* и *win2* (Stanford, et al., (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); системин (McGurl, et al., (1992) *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier, et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp, et al., (1993) *FEBS Letters* 323:73-76); ген MPI (Corderok, et al., (1994) *Plant J.* 6(2):141-150) и т.п., включенные в данный документ посредством ссылки.

Кроме того, в способах и нуклеотидных конструкциях согласно вариантам осуществления можно использовать индуцируемые патогеном промоторы. Такие индуцируемые патогеном промоторы включают промоторы из белков, связанных с патогенезом (PR-белков), которые индуцируются после заражения патогеном; например PR-белков, SAR-белков, бета-1,3-глюканазы, хитиназы и т.д. См., например, Redolfi, et al., (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknies, et al., (1992) *Plant Cell* 4: 645-656 и Van Loon, (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. См. также WO 1999/43819, включенную в данный документ посредством ссылки.

Представляют интерес промоторы, которые экспрессируются локально в месте заражения патогеном или вблизи него. См., например, Marineau, et al., (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton, et al., (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch, et al., (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98 и Yang, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. См. также Chen, et al., (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang, et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner, et al., (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz, et al., (1989) *Plant Cell* 1:961-968; патент США № 5750386 (индуцируемый нематодами); а также источники, приведенные в данных документах. Особый интерес представляет индуцируемый промотор для гена PRms маиса, экспрессия которого индуцируется патогеном *Fusarium moniliforme* (см., например, Cordero, et al., (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:189-200).

Регулируемые химическими веществами промоторы можно использовать для модулирования экспрессии гена в растении посредством применения экзогенного химического регулятора. В зависимости от цели, промотор может представлять собой индуцируемый химическим веществом промотор, при этом применение химического вещества индуцирует экспрессию гена, или репрессуемый химическим веществом промотор, при этом применение химического вещества подавляет экспрессию гена. Индуцируемые химическими веществами промоторы известны в уровне техники и включают без ограничения промотор *In2-2* маиса, который активируется антителами к бензолсульфонамидным гербицидам, промотор *GST* маиса, который активируется гидрофобными электрофильными соединениями, которые применяются в качестве предвсходовых гербицидов, и промотор *PR-1a* табака, который активируется салициловой кислотой. Другие регулируемые химическими веществами промоторы, представляющие интерес, включают чувствительные к стероидам промоторы (см., например, индуцируемый глюкокортикоидом промотор в Schena, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 и McNellis, et al., (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) и индуцируемые тетрациклином и репрессуемые тетрациклином промоторы (см., например, Gatz, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237 и патенты США № 5814618 и 5789156), включенные в данный документ посредством ссылки.

Для целенаправленного воздействия на усиленную экспрессию полипептида IPD090 в конкретной ткани растения можно использовать предпочтительные в отношении ткани промоторы. Предпочтительные для ткани промоторы включают промоторы, обсуждаемые в Yamamoto, et al., (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata, et al., (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen, et al., (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell, et al., (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart, et al., (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp, et al., (1996) *Plant Physiol.* 112 (2):525-535; Canevascini, et al., (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto, et al., (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam, (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco, et al., (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka, et al., (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90 (20):9586-9590 и Guevara-Garcia, et al., (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Из уровня техники известны дополнительные тканеспецифические промоторы, в том числе промоторы из патентов США № US8816152 и US9150624. Такие промоторы можно модифицировать в случае необходимости для получения слабой экспрессии.

Промоторы, предпочтительные для листа, известны из уровня техники. См., например, Yamamoto, et al., (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kwon, et al., (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67;

Yamamoto, et al., (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Gotor, et al., (1993) *Plant J.* 3:509-18; Orozco, et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6):1129-1138 и Matsuoka, et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590.

Известны предпочтительные для завязки на патент США промоторы или специфичные в отношении корня промоторы, и их можно выбирать из многих доступных из литературы или выделенных *de novo* из

различных совместимых видов. См., например, Hire, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (специфичный в отношении корня сои ген глутаминсинтетазы); Keller and Baumgartner, (1991) *Plant Cell* 3 (10):1051-1061 (специфичный в отношении корня регуляторный элемент в гене GRP 1.8 фасоли); Sanger, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (специфичный в отношении корня промотор гена маннопинсинтазы (MAS) из *Agrobacterium tumefaciens*) и Miao, et al., (1991) *Plant Cell* 3(1): 11-22 (полноразмерный кДНК-клон, кодирующий цитозольную глутаминсинтетазу (GS), которая экспрессируется в корнях и корневых клубеньках сои). См. также Bogusz, et al., (1990) *Plant Cell* 2(7): 633-641, где описаны два промотора, специфичные в отношении корня, выделенные из генов гемоглобина от азотфиксирующего растения *Parasponia andersonii*, не относящегося к бобовым, и родственного растения *Trema tomentosa*, не относящегося к бобовым и не являющегося азотфиксирующим. Промоторы этих генов были связаны с репортерным геном β -глюкуронидазы и введены как в растение *Nicotiana tabacum*, не относящееся к бобовым, так и в бобовое растение *Lotus corniculatus*, и при этом в обоих случаях специфичная в отношении корня активность промотора сохранялась. Leach и Aoyagi (1991) описывают свой анализ промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии генов *roIC* и *roID* *Agrobacterium rhizogenes*, индуцирующих разрастание корней (см. *Plant Science* (Limerick) 79(1):69-76). Они пришли к выводу, что в этих промоторах энхансер и предпочтительные для ткани ДНК-детерминанты разделены. Teeri et al. (1989) применяли слияние гена с *lacZ* для того, чтобы показать, что ген из T-DNA *Agrobacterium*, кодирующий октопинсинтазу, является особенно активным в эпидермисе кончика корня, и что ген TR2' является специфичным в отношении корня в интактном растении и стимулируется при ранении в ткани листа, что является особенно необходимой комбинацией характеристик для применения с инсектицидным или ларвицидным геном (см. *EMBO J.* 8 (2): 343-350). Ген TR1', слитый с *nptII* (неомицинофосфотрансферазой II), продемонстрировал аналогичные характеристики. Дополнительные промоторы, предпочтительные для корня, включают промотор гена *VfENOD-GRP3* (Kuster, et al., (1995) *Plant Mol. Biol.* 29(4):759-772) и промотор *rolB* (Sarana, et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 25(4):681-691). См. также, патенты США № 5837876; 5750386; 5633363; 5459252; 5401836; 5110732 и 5023179. Предпочтительные для корней регуляторные последовательности *Arabidopsis thaliana* раскрыты в US20130117883. В публикации заявки на патент США № US20160097054 раскрыт промотор PLTP, предпочтительный для корней сорго. В публикации заявки на патент США № US20160145634 раскрыт промотор TIP2-3, предпочтительный для корней сорго. В патенте США № US8916377 раскрыт промотор RCc3, предпочтительный для корней сорго.

Промоторы, "предпочтительные для семени", включают как промоторы "специфичные в отношении семени" (промоторы, которые активны во время развития семени, такие как промоторы запасных белков семени), так и промоторы "прорастания семени" (промоторы, которые активны во время прорастания семени). См. Thompson, et al., (1989) *BioEssays* 10:108, включенную в данный документ посредством ссылки. Такие промоторы, предпочтительные для семени, включают без ограничения *Cim1* (индуцируемый цитокинином транскрипт); CZ19B1 (зеин маиса весом 19 кДа) и *milps* (мио-инозитол-1-фосфатсинтаза); (см. патент США № 6225529, включенный в данный документ посредством ссылки). Гамма-зеин и *Glb-1* являются специфичными в отношении эндосперма промоторами. В случае двудольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промотор гена ингибитора трипсина-3 типа Кунитц (KTi3) (Jofuku and Goldberg, (1989) *Plant Cell* 1:1079-1093), β -фазеолина бобов, напина, β -конглицинина, глицинина 1, лектина сои, круциферина и т.п. В случае однодольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промоторы из генов зеина весом 15 кДа, зеина весом 22 кДа, зеина весом 27 кДа, g-зеина, *waxy*, *shrunken 1*, *shrunken 2*, глобулина 1 маиса и т.д. См. также WO 2000/12733, где раскрыты промоторы, предпочтительные для семени, из генов *end1* и *end2*, включенный в данный документ посредством ссылки. У двудольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промотор гена белков семенной оболочки из *Arabidopsis*, *pBAN*; а также промоторы генов раннего развития семян из *Arabidopsis*, *p26*, *p63* и *p63tr* (патенты США № 7294760 и 7847153). Промотор, который характеризуется "предпочтительной" экспрессией в конкретной ткани, экспрессируется в такой ткани в большей степени, чем по меньшей мере в одной другой растительной ткани. Для некоторых предпочтительных для ткани промоторов показана экспрессия почти исключительно в конкретной ткани.

Если требуется низкий уровень экспрессии, то будут применять слабые промоторы. В целом, используемый в данном документе термин "слабый промотор" относится к промотору, который управляет экспрессией кодирующей последовательности на низком уровне. Под низким уровнем экспрессии подразумевают уровни от приблизительно 1/1000 транскриптов до приблизительно 1/100000 транскриптов, до приблизительно 1/500000 транскриптов. В качестве альтернативы понятно, что термин "слабые промоторы" также охватывает промоторы, которые управляют экспрессией только в небольшом количестве клеток и не управляют в других, при этом обеспечивается общий низкий уровень экспрессии. Если промотор управляет экспрессией на неприемлемо высоких уровнях, то части промоторной последовательности можно удалить или модифицировать для снижения уровней экспрессии.

Такие слабые конститутивные промоторы включают, например, основной промотор промотора *Rsyn7* (WO 1999/43838 и патент США № 6072050), основной промотор 35S CaMV и т.п. Другие консти-

тутивные промоторы включают, например, раскрытые в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142, 6177611 и 8697857, включенных в данный документ посредством ссылки.

Химерные или гибридные промоторы также известны из уровня техники, в том числе раскрытые в патентах США № US8846892, US8822666 и US9181560.

Приведенный выше перечень промоторов не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой подходящий промотор.

Как правило, кассета экспрессии будет содержать селективируемый маркерный ген для отбора трансформированных клеток. Селективируемые маркерные гены используют для отбора трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотику, такие как гены, кодирующие неомизинфосфотрансферазу II (NEO) и гигромицинфосфотрансферазу (HPT), а также гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидным соединениям, таким как глюфосинат аммония, бромоксиинил, имидазолиноны и 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). Дополнительные примеры подходящих селективируемых маркерных генов включают без ограничения гены, кодирующие устойчивость к хлорамфениколу (Herrera Estrella, et al., (1983) *EMBO J.* 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella, et al., (1983) *Nature* 303:209-213 и Meijer, et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); стрептомицину (Jones, et al., (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); спектиномицину (Bretagne-Sagnard, et al., (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); блеомицину (Hille, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 1:171-176); сульфонамиду (Guerineau, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); бромоксиинилу (Stalker, et al., (1988) *Science* 242:419-423); глифосату (Shaw, et al., (1986) *Science* 233:478-481 и заявки на патенты США с серийными № 10/004357 и 10/427692); фосфинотрицину (DeBlock, et al., (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518). См., в целом, Yarranton, (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao, et al., (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff, (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley, et al., (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu, et al., (1987) *Cell* 48:555-566; Brown, et al., (1987) *Cell* 49:603-612; Figge, et al., (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle, et al., (1990) *Science* 248:480-483; Gossen, (1993) диссертация на соискание научной степени доктора, Гейдельбергский университет; Reines, et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow, et al., (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski, et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman, (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb, et al., (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt, et al., (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin, (1993) диссертация на соискание научной степени доктора, Гейдельбергский университет; Gossen, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva, et al., (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka, et al., (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin) и Gill, et al., (1988) *Nature* 334:721-724. Такие раскрытия включены в данный документ посредством ссылки.

Приведенный выше перечень селективируемых маркерных генов не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой селективируемый маркерный ген.

Трансформация растений.

Способы согласно вариантам осуществления включают введение полипептида или полинуклеотида в растение. "Введение", как используется в данном документе, означает включение в растение полинуклеотида или полипептида таким образом, что последовательность попадает внутрь клетки растения. Способы согласно вариантам осуществления не зависят от конкретного способа введения полинуклеотида или полипептида в растение, нужно лишь чтобы полинуклеотид или полипептиды проникали внутрь по меньшей мере одной клетки растения. Из уровня техники известны способы введения полинуклеотида и/или полипептидов в растения, в том числе без ограничений способы стабильной трансформации, способы транзиторной трансформации и способы трансформации, опосредованной вирусами.

"Стабильная трансформация", как используется в данном документе, означает, что нуклеотидная конструкция, введенная в растение, интегрируется в геном растения и может наследоваться его потомством. "Транзиторная трансформация", как используется в данном документе, означает, что полинуклеотид вводят в растение, и он не интегрируется в геном растения, или в растение вводят полипептид. Термин "растение", используемый в данном документе, относится к целым растениям, органам растения (например, листьям, стеблям, корням и т.д.), семенам, растительным клеткам, частям растения для вегетативного размножения, зародышам и их потомству. Растительные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, клетками каллюса, клетками суспензионных культур, протопластами, клетками листьев, клетками корней, клетками флоэмы и пыльцой).

Протоколы трансформации, а также протоколы для введения нуклеотидных последовательностей в растения, могут изменяться в зависимости от типа растения или растительной клетки, т. е. класса однодольных или двудольных, на которые нацелена трансформация. Подходящие способы введения нуклеотидных последовательностей в растительные клетки и последующая вставка в геном растения включают микроинъекцию (Crossway, et al., (1986) *Biotechniques* 4:320-334), электропорацию (Riggs, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606), трансформацию, опосредованную *Agrobacterium* (патенты США

№ 5563055 и 5981840), прямой перенос генов (Paszkowski, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722) и баллистическое ускорение частиц (см., например, патенты США № 4945050; 5879918; 5886244 и 5932782; Tomes, et al., (1995) в *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips, (Springer-Verlag, Berlin) и McCabe, et al., (1988) *Biotechnology* 6:923-926) и трансформацию гена *Lecl* (WO 00/28058). Относительно трансформации картофеля см. Tu, et al., (1998) *Plant Molecular Biology* 37:829-838 и Chong, et al., (2000) *Transgenic Research* 9:71-78.

Дополнительные процедуры трансформации можно найти в Weissinger, et al., (1988) *Алл. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford, et al., (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (лук репчатый); Christou, et al., (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (соя); McCabe, et al., (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (соя).

Finer and McMullen, (1991) *Тл Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (соя); Singh, et al., (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (соя); Datta, et al., (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (рис).

Klein, et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (маис); Klein, et al., (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (маис).

Патенты США № 5240855; 5322783 и 5324646; Klein, et al., (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (маис); Fromm, et al., (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (маис); Hooykaas-Van Slogteren, et al., (1984) *Nature (London)* 311:763-764; патент США № 5736369 (злаки); Bytebier, et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet, et al., (1985) в *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman, et al., (Longman, New York), pp. 197-209 (пыльца); Каерплер, et al., (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 и Каерплер, et al., (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (трансформация, опосредованная прокалыванием клеток путем встряхивания их в суспензии микроигл); D'Halluin, et al., (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (электропорация); Li, et al., (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 и Christou and Ford, (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (рис); Osjoda, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (маис при участии *Agrobacterium tumefaciens*); все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления последовательности согласно вариантам осуществления можно вводить в растение с применением ряда способов транзientной трансформации. Такие способы временной трансформации включают без ограничения введение полинуклеотида IPD090 или его вариантов и фрагментов непосредственно в растение или введение транскрипта полипептида IPD090 в растение. Такие способы включают, например, микроинъекцию или бомбардировку частицами. См., например, Crossway, et al., (1986) *Mol Gen. Genet.* 202:179-185; Nomura, et al., (1986) *Plant Sci.* 44:53-58; Hepler, et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2176-2180 и Hush, et al., (1994) *The Journal of Cell Science* 107:775-784, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы растение можно транзientно трансформировать с помощью полинуклеотида IPD090 с применением методик, известных из уровня техники. Такие методики включают применение вирусной векторной системы и осаждение полинуклеотида таким способом, который исключает последующее высвобождение ДНК. Таким образом, может происходить транскрипция ДНК, связанной с частицами, однако частота, с которой она высвобождается для интеграции в геном, в значительной степени снижена. Такие способы включают применение частиц, покрытых полиэтиленгликолем (PEI; № по кат. Sigma P3143).

Из уровня техники известны способы нацеленной вставки полинуклеотида в конкретное местоположение в геноме растения. В одном варианте осуществления вставку полинуклеотида в требуемое местоположение в геноме выполняют с использованием системы сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Вкратце, полинуклеотид согласно вариантам осуществления может содержаться в кассете для переноса, фланкированной двумя неидентичными сайтами рекомбинации. Кассету для переноса вводят в растение, имеющее в своем геноме стабильно встроенный целевой сайт, который фланкирован двумя неидентичными сайтами рекомбинации, которые соответствуют сайтам кассеты для переноса. Обеспечивают подходящую рекомбиназу, и кассета для переноса интегрируется в целевой сайт. Полинуклеотид, представляющий интерес, таким образом интегрируется в конкретное хромосомное положение в геноме растения.

Векторы для трансформации растений могут состоять из одного или нескольких ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растения. Например, общепринятой практикой в области техники является использование векторов для трансформации растений, которые состоят из более одного смежного сегмента ДНК. В уровне техники эти векторы зачастую называют "бинарными векторами". Бинарные векторы, а также векторы с плазмидами-помощниками наиболее часто применяются при трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, при этом размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются очень большими, и предпочтительным является разделение функций на отдельных молекулах ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, который содержит действующие в цис-положении последовательности, требуемые для переноса T-DNA (как, например, левой границы и правой границы), селективируемый маркер, который разрабатывают таким образом, что он способен экспрессироваться в растительной клетке, и "ген, представляющий интерес" (ген, разработанный таким образом, что он способен экспрессироваться в растительной клетке, из которой требуется получить трансгенные растения). Также в этом плазмидном векторе присутствуют последовательности, необходимые для репликации в бактериях. Действующие в цис-

положении последовательности расположены так, чтобы обеспечить возможность эффективного переноса в растительные клетки и экспрессии в них. Например, селективируемый маркерный ген и пестицидный ген расположены между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит действующие в транс-положении факторы, которые опосредуют перенос T-DNA из *Agrobacterium* в растительные клетки. Эта плазида часто содержит функции вирулентности (гены Vir), что обеспечивает возможность заражения растительных клеток *Agrobacterium* и перенос ДНК путем расщепления по граничным последовательностям и переноса ДНК, опосредованного vir, как понятно из уровня техники (Hellens and Mullineaux, (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Для трансформации растений можно применять несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т. п.). Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений другими способами, такими как бомбардировка микрочастицами, микроинъекция, электропорация, с помощью полиэтиленгликоля и т.д.

В целом, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые растительные клетки (например, незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.), с последующим применением соответствующего отбора с максимальным пороговым значением (в зависимости от селективируемого маркерного гена) для выделения трансформированных растительных клеток из группы нетрансформированной клеточной массы. После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки затем применяют соответствующий отбор с максимальным пороговым значением в среде для уничтожения нетрансформированных клеток и отделения и размножения предположительно трансформированных клеток, которые переживают эту обработку с отбором, посредством регулярного переноса на свежую среду. С помощью продолжающегося пассирования и проверки с помощью соответствующего отбора идентифицируют и размножают клетки, которые трансформированы плазмидным вектором. Затем можно применять молекулярные и биохимические способы для подтверждения присутствия интегрированного гетерологичного гена, представляющего интерес, в геноме трансгенного растения.

Как правило, эксплантаты переносят на свежую порцию той же среды и культивируют обычным способом. Впоследствии трансформированные клетки дифференцируются в побеги после помещения в среду для регенерации, дополненную средством отбора с максимальным пороговым значением. Затем побеги переносят на селективную среду для выращивания растений с получением укоренившихся побегов или саженцев. Затем трансгенный саженец выращивают до зрелого растения и получают фертильные семена (например, Hiei, et al., (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida, et al., (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Как правило, эксплантаты переносят на свежую порцию той же среды и культивируют обычным способом. Общее описание методик и способов для получения трансгенных растений приведены в Ayres and Park, (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 и Bommineni and Jauhar, (1997) Maydica 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит множество клеток, то как трансформированные, так и нетрансформированные клетки присутствуют в любой части подвергнутого воздействию целевого каллуса, или ткани, или группы клеток. Возможность уничтожить нетрансформированные клетки и обеспечить размножение трансформированных клеток приводит в результате к трансформированным растительным культурам. Зачастую, возможность удаления нетрансформированных клеток является ограничивающим фактором для быстрого получения трансформированных растительных клеток и успешного выращивания трансгенных растений.

Из клеток, которые были трансформированы, можно вырастить растения в соответствии с традиционными способами. См., например, McCormick, et al., (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Эти растения затем можно выращивать и опылять либо с использованием такой же трансформированной линии, либо других линий, и получать гибрид с конститутивной или индуцируемой экспрессией требуемой идентифицированной фенотипической характеристики. Можно вырастить два или больше поколений для того, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемой фенотипической характеристики стабильно поддерживается и наследуется, а затем собрать семена, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемой фенотипической характеристики была достигнута.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно обеспечить в растении путем приведения растения в контакт с вирусом или вирусными нуклеиновыми кислотами. Как правило, такие способы включают встраивание нуклеотидной конструкции, представляющей интерес, в вирусную молекулу ДНК или РНК. Понятно, что рекомбинантные белки согласно вариантам осуществления можно исходно синтезировать как часть вирусного полипротеина, который позже может быть процессирован путем протеолиза *in vivo* или *in vitro* с получением требуемого полипептида IPD090. Также понятно, что такой вирусный полипротеин, содержащий, по меньшей мере, часть аминокислотной последовательности IPD090 согласно вариантам осуществления, может обладать требуемой пестицидной активностью. Такие вирусные полипротеины и нуклеотидные последовательности, которые их кодируют, охвачены вариантами осуществления. Способы получения растений с нуклеотидными конструкциями и продуцирования кодируемых белков в растениях, которые включают молекулы вирусных ДНК или РНК, известны из уровня техники. См., например, патенты США № 5889191; 5889190; 5866785; 5589367 и 5316931; включенные в данный документ посредством ссылки.

Способы трансформации хлоропластов известны из уровня техники. См., например, Svab, et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga, (1993) EMBO J. 12:601-606. Способ основан на доставке геной пушкой ДНК, содержащей селективируемый маркер, и нацеливании ДНК в геном пластид с помощью гомологичной рекомбинации. Кроме того, трансформацию пластид можно осуществлять трансактивацией молчащего трансгена, находящегося в пластидах, путем экспрессии, предпочтительной для определенной ткани, РНК-полимеразы, кодируемой ядерным геномом и функционирующей в пластиде. О такой системе сообщали в McBride, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Варианты осуществления дополнительно относятся к материалу для размножения трансформированного растения согласно вариантам осуществления, в том числе без ограничения семенам, клубням, клубнелуковицам, луковицам, листьям и черенкам корней и побегов.

Варианты осуществления можно применять для трансформации любых видов растений, в том числе без ограничения однодольных и двудольных. Примеры растений, представляющих интерес, включают без ограничений кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности виды *Brassica*, пригодные в качестве источников масла из семян растений, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, пennisетум рогозовидный (*Pennisetum glaucum*), просо культурное (*Panicum miliaceum*), щетинник итальянский (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), разновидности арахиса (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофейное дерево (*Coffea* spp.), кокосовую пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), шоколадное дерево (*Theobroma cacao*), чайный куст (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамии (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), разновидности сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), разновидности овса, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

Овощи включают разновидности томата (*Lycopersicon esculentum*), латук (например, *Lactuca sativa*), разновидности зеленой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), разновидности лимской фасоли (*Phaseolus limensis*), разновидности гороха (*Lathyrus* spp.) и представителей рода *Cucumis*, таких как огурец (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) и дыня мускусная (*C. melo*). Декоративные растения включают азалию (*Rhododendron* spp.), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (*Rosa* spp.), тюльпаны (*Tulipa* spp.), нарциссы (*Narcissus* spp.), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансеттию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные, которые можно использовать при практическом осуществлении вариантов осуществления, включают, например, разновидности сосны, такие как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна желтая (*Pinus ponderosa*), сосна скрученная широкохвойная (*Pinus contorta*) и сосна лучистая (*Pinus radiata*); псевдотсугу Мензиса (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу канадскую (*Tsuga canadensis*); ель сизую (*Picea glauca*); секвойю (*Sequoia sempervirens*); разновидности пихты, такие как пихта миловидная (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*), и разновидности туйи, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитропис нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения согласно вариантам осуществления включают культурные растения (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, *Brassica*, сою, хлопчатник, сафлор, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак и т.д.), такие как растения кукурузы и сои.

Разновидности газонной травы включают без ограничения: мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс однолетний (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяницу красную Чуинга (*Festuca rubra*); полевицу тонкую (*Agrostis tenuis*); полевицу болотную (*Agrostis palustris*); житняк пустынный (*Agropyron desertorum*); житняк гребенчатый (*Agropyron cristatum*); овсяницу длиннолистную (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежу сборную (*Dactylis glomerata*); плевел многолетний (*Lolium perenne*); овсяницу красную (*Festuca rubra*); полевицу белую (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяницу овечью (*Festuca ovina*); костер безостый (*Bromus inermis*); овсяницу тростниковую (*Festuca arundinacea*); тимфеевку луговую (*Phleum pratense*); полевицу собачью (*Agrostis canina*); бескильницу расставленную (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); свиной пальчатый (*Cynodon* spp.); узкобороздник однобокий (*Stenotaphrum secundatum*); зойсию (*Zoysia* spp.); гречку заметную (*Paspalum notatum*); аксонопс афинский (*Axonopus affinis*); эремохлою змеехвостую (*Eremochloa ophiuroides*); кикуйю (*Pennisetum clandestinum*); паспалум влагалищный (*Paspalum vaginatum*); москитную траву (*Bouteloua gracilis*); бизонову траву (*Buchloe dactyloids*); боковой овес (*Bouteloua curtipendula*).

Растения, представляющие интерес, включают зерновые растения, которые дают семена, представляющие интерес, масличные растения и бобовые растения. Семена, представляющие интерес, включают семена зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и т.д. Масличные растения включают хлопчатник, сою, сафлор, подсолнечник, *Brassica*, маис, люцерну, пальму, кокосовую пальму, лен, клещевину, маслину и т.д. Бобовые растения включают разновидности бобов и разновидности гороха. Бобы включают гуар, рожковое дерево, пажитник, сою, разновидности обыкновен-

ной фасоли, вигну китайскую, золотистую фасоль, лимскую фасоль, стручковую фасоль, разновидности чечевицы, турецкий горох и т.д.

Оценка трансформации растений.

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают с помощью различных способов, таких как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ представляет собой быстрый способ скрининга трансформированных клеток, ткани или побегов в отношении присутствия встроенного гена на ранней стадии перед высаживанием в почву (Sambrook and Russell, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР проводят с применением олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении гена, представляющего интерес, или исходных последовательностей вектора на основе *Agrobacterium* и т.д.

Трансформацию растений можно подтвердить с помощью Саузерн-блот анализа геномной ДНК (Sambrook and Russell, (2001) выше). В целом, общую ДНК экстрагируют из трансформанта, нарезают соответствующими ферментами рестрикции, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Затем мембрану или "блот" анализируют с помощью зонда, например целевого фрагмента ДНК с радиоактивной меткой ³²P, с целью подтверждения интеграции внедренного гена в геном растения в соответствии со стандартными методиками (Sambrook и Russell, (2001) выше).

При нозерн-блот анализе РНК выделяют из специфичных тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносят на нейлоновый фильтр в соответствии со стандартными процедурами, которые обычно применяют в области техники (Sambrook and Russell, (2001) выше). Затем экспрессию РНК, кодируемой пестицидным геном, тестировали с помощью гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из пестицидного гена, посредством способов, известных в уровне техники (Sambrook и Russell, (2001) выше).

Вестерн-блот, биохимические анализы и им подобные можно проводить в отношении трансгенных растений для подтверждения присутствия белка, кодируемого пестицидным геном, с помощью стандартных процедур (Sambrook и Russell, 2001, выше) с применением антител, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими на полипептиде IPD090.

Способы внедрения технологий редактирования генома в отношении растений.

В некоторых вариантах осуществления композиции на основе раскрываемого полинуклеотида IPD090 можно вводить в геном растения с применением технологий редактирования генома, или ранее введенные полинуклеотиды IPD090 в геноме растения можно редактировать с применением технологий редактирования генома. Например, раскрываемые полинуклеотиды можно вводить в требуемое местоположение в геноме растения посредством технологий введения двухнитевого разрыва, таких как TALEN, использование мегануклеаз, нуклеаз с "цинковыми пальцами", CRISPR-Cas и т.п. Например, раскрываемые полинуклеотиды можно вводить в требуемое местоположение в геноме с помощью системы CRISPR-Cas с целью создания сайт-специфической вставки. Требуемой областью в геноме растения может быть любой требуемый целевой сайт для вставки, например участок генома, подходящий для скрещивания; или им может быть целевой сайт, расположенный в геномном окне с уже существующим представляющим интерес признаком. Представляющий интерес существующий признак может быть как эндогенным признаком, так и ранее введенным признаком.

В некоторых вариантах осуществления, где раскрываемый полинуклеотид IPD090 был ранее введен в геном, технологии редактирования генома можно использовать для изменения или модификации вводимой полинуклеотидной последовательности. Сайт-специфичные модификации, которые можно вводить в композиции на основе раскрываемого полинуклеотида IPD090, включают те модификации, которые осуществлены с помощью любого способа введения сайт-специфичной модификации, включая без ограничений использование олигонуклеотидов для репарации генов (например, публикация патента США 2013/0019349), или использование технологий введения двухнитевого разрыва, таких как TALEN, использование мегануклеаз, нуклеаз с "цинковыми пальцами", CRISPR-Cas и т.п. Такие технологии можно использовать для модификации ранее введенного полинуклеотида посредством вставки, делеции или замены нуклеотидов в пределах введенного полинуклеотида. Альтернативно технологии введения двухнитевого разрыва можно использовать для добавления дополнительных нуклеотидных последовательностей во вводимый полинуклеотид. Дополнительные последовательности, которые можно добавлять, включают в себя дополнительные элементы экспрессии, такие как энхансерные и промоторные последовательности. В другом варианте осуществления технологии редактирования генома можно использовать для размещения дополнительных белков с инсектицидной активностью в непосредственной близости с композициями на основе раскрываемого полинуклеотида IPD090, раскрытыми в данном документе, в пределах генома растения, чтобы создавать молекулярные пакеты белков с инсектицидной активностью.

Термин "измененный целевой сайт", "измененная целевая последовательность", "модифицированный целевой сайт" и "модифицированная целевая последовательность", используемые в данном доку-

менте взаимозаменяемо, означают целевую последовательность, раскрываемую в данном документе, которая содержит по меньшей мере одно изменение по сравнению с неизменной целевой последовательностью. Такие "изменения" включают, например, (i) замену по меньшей мере одного нуклеотида, (ii) делецию по меньшей мере одного нуклеотида, (iii) вставку по меньшей мере одного нуклеотида или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Пакетирование признаков в трансгенном растении Трансгенные растения могут содержать пакет из одного или нескольких инсектицидных полинуклеотидов, раскрываемых в данном документе, с одним или несколькими дополнительными полинуклеотидами, приводящими к продуцированию или обеспечению супрессии нескольких полипептидных последовательностей.

Трансгенные растения, содержащие пакеты из полинуклеотидных последовательностей, можно получить либо с помощью традиционных способов скрещивания, либо посредством способов генной инженерии, либо применяя и то, и другое. Эти способы включают без ограничений размножение индивидуальных линий, при этом каждая содержит полинуклеотид, представляющий интерес, трансформацию трансгенного растения, содержащего ген, раскрытый в данном документе, добавочным геном и котрансформацию генов одной растительной клетки. Используемый в данном документе термин "пакетированный" предусматривает состояние, при котором в одном растении присутствуют несколько признаков (т.е. оба признака включены в ядерный геном, один признак включен в ядерный геном и один признак включен в геном пластиды, или оба признака включены в геном пластиды). В одном неограничивающем примере "пакетированные признаки" предусматривают молекулярный пакет, в котором последовательности физически граничат друг с другом. Термин "признак", используемый в данном документе, относится к фенотипу, обусловленному конкретной последовательностью или группами последовательностей.

Котрансформацию генов можно проводить с применением единых векторов для трансформации, содержащих несколько генов, или нескольких векторов, которые несут отдельные гены. Если последовательности пакетированы с помощью генетической трансформации растений, то представляющие интерес полинуклеотидные последовательности можно комбинировать в любое время и в любом порядке. Признаки можно вводить одновременно в протоколе котрансформации с представляющими интерес полинуклеотидами, представленными любой комбинацией каскад трансформации. Например, если будут вводиться две последовательности, то эти две последовательности могут содержаться в отдельных каскадах для трансформации (транс) или содержаться в одной каскаде для трансформации (цис). Экспрессия этих последовательностей может управляться одним и тем же промотором или различными промоторами. В определенных случаях может потребоваться введение каскады для трансформации, которая будет обеспечивать супрессию экспрессии представляющего интерес полинуклеотида. Ее можно комбинировать с любой комбинацией других каскад супрессии или каскад сверхэкспрессии для получения требуемой комбинации признаков в растении. Кроме того, считается, что полинуклеотидные последовательности можно пакетировать в требуемом местоположении в геноме с применением системы для сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептид IPD090, раскрываемые в данном документе, отдельно или пакетированные с одним или несколькими дополнительными признаками устойчивости к насекомым, можно пакетировать с одним или несколькими дополнительными вводимыми признаками (например, с устойчивостью к гербициду, устойчивостью к грибам, устойчивостью к вирусам, переносимостью стрессов, устойчивостью к заболеваниям, мужской стерильностью, силой стебля и т.п.), или с признаками, влияющими на продукцию (например, повышенная урожайность, разновидности модифицированного крахмала, улучшенный профиль масел, сбалансированные аминокислоты, высокое содержание лизина или метионина, повышенная усвояемость, улучшенное качество волокон, устойчивость к засухе и т.п.). Таким образом, варианты осуществления полинуклеотида можно применять для обеспечения полного комплекса агрономических признаков, обеспечивающих улучшенное качество сельскохозяйственной культуры, с возможностью гибкого и экономически эффективного контроля любого количества сельскохозяйственных вредителей.

Трансгены, пригодные для пакетирования, включают без ограничения приведенные ниже.

1) Трансгены, которые обеспечивают устойчивость к насекомым или заболеваниям и которые кодируют приведенные ниже:

(А) гены устойчивости растения к заболеваниям. Защитные механизмы растений зачастую активируются посредством специфического взаимодействия между продуктом гена устойчивости к заболеваниям (R) в растении и продуктом соответствующего гена авирулентности (Avr) в патогене. Разновидность растения можно трансформировать с помощью клонированного гена устойчивости с целью разработки растений, которые устойчивы к специфичным штаммам патогена. См., например, Jones, et al., (1994) *Science* 266:789 (клонирование гена Cf-9 томата, обеспечивающего устойчивость к *Cladosporium fulvum*); Martin, et al., (1993) *Science* 262:1432 (ген Pto томата, обеспечивающий устойчивость к *Pseudomonas syringae* pv. томата, кодирует протеинкиназу); Mindrinos, et al., (1994) *Cell* 78:1089 (ген RSP2 *Arabidopsis*, обеспечивающий устойчивость к *Pseudomonas syringae*), McDowell and Woffenden, (2003) *Trends Biotechnol.* 21(4):178-83 и Toyoda, et al., (2002) *Transgenic Res.* 11(6):567-82. Растение, устойчивое к заболева-

нию, представляет собой растение, которое более устойчиво к патогену по сравнению с растением дико-го типа;

(В) гены, кодирующие белок *Bacillus thuringiensis*, его производное или синтетический полипептид, смоделированный на его основе. См., например, Geiser, et al., (1986) Gene 48:109, которые раскрывают клонирование и нуклеотидную последовательность гена дельта-эндотоксина Bt. Кроме того, молекулы ДНК, кодирующие гены дельта-эндотоксина, можно приобрести в Американской коллекции типовых культур (Роквилл, Мэриленд), например, под номерами доступа ATCC® 40098, 67136, 31995 и 31998. Другие неограничивающие примеры трансгенов *Bacillus thuringiensis*, разработанных с помощью методик генной инженерии, приведены в следующих патентах и заявках на патенты и тем самым включены посредством ссылки для данной цели: патенты США № 5188960; 5689052; 5880275; 5986177; 6023013, 6060594, 6063597, 6077824, 6620988, 6642030, 6713259, 6893826, 7105332; 7179965, 7208474; 7227056, 7288643, 7323556, 7329736, 7449552, 7468278, 7510878, 7521235, 7544862, 7605304, 7696412, 7629504, 7705216, 7772465, 7790846, 7858849, 9546378; публикация заявки на патент США US20160376607 и WO 1991/14778; WO 1999/31248; WO 2001/12731; WO 1999/24581 и WO 1997/40162.

Гены, кодирующие пестицидные белки, также можно пакетировать, в том числе без ограничения с инсектицидными белками из *Pseudomonas* sp., такими как PSEEN3174 (Monalysin, (2011) PLoS Pathogens, 7:1-13), из штаммов CHA0 и Pf-5 *Pseudomonas protegens* strain (панее fluorescens) (Pechy-Tarr, (2008) Environmental Microbiology 10:2368-2386: № доступа в GenBank EU400157); из *Pseudomonas taiwanensis* (Liu, et al., (2010) J. Agric. Food Chem. 58:12343-12349) и из *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhang, et al., (2009) Annals of Microbiology 59:45-50 и Li, et al., (2007) Plant Cell Tiss. Organ Cult. 89:159-168); инсектицидные белки из *Photorhabdus* sp. и *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) The Open Toxinology Journal, 3:101-118 и Morgan, et al., (2001) Applied and Envir. Micro. 67:2062-2069), патент США № 6048838 и патент США № 6379946; полипептид PIP-1 из публикации заявки на патент США US20140007292; полипептиды AfIP-1A и/или AfIP-1B из публикации заявки на патент США US20140033361; полипептид PNI-4 из публикации заявки на патент США US20140274885 и US20160040184; полипептид PIP-47 из публикации согласно PCT с № WO2015/023846, полипептид PIP-72 из публикации патента США № US20160366891; полипептид PiIP-50 и полипептид PiIP-65 из публикации согласно PCT с № WO2015/120270; полипептид PiIP-83 из публикации согласно PCT с № WO2015/120276; полипептид PiIP-96 из публикации согласно PCT с серийным № PCT/US15/55502; полипептид IPD079 из публикации согласно PCT с № WO2017/023486; полипептид IPD082 из патентного документа с серийным № PCT/US16/65531; полипептид IPD093 из патентного документа США с серийным № 62/434020; полипептид IPD080 из патентного документа США с серийным № US62/411318; и δ-эндотоксины, в том числе без ограничения гены δ-эндотоксинов классов Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry15, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry22, Cry23, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry 28, Cry 29, Cry 30, Cry31, Cry32, Cry33, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry38, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry45, Cry 46, Cry47, Cry49, Cry50, Cry51, Cry52, Cry53, Cry 54, Cry55, Cry56, Cry57, Cry58, Cry59, Cry60, Cry61, Cry62, Cry63, Cry64, Cry65, Cry66, Cry67, Cry68, Cry69, Cry70, Cry71, и Cry72 и гены цитолитических токсинов Cyt1 и Cyt2 *B. thuringiensis*. Представители этих классов инсектицидных белков из *B. thuringiensis* хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на веб-сайте по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ к которому можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www").

Примеры δ-эндотоксинов также включают без ограничения белки Cry1A из патентов США № 5880275, 7858849 и 8878007; мутант Cry1Ac из US9512187; токсин DIG-3 или DIG-11 (варианты белков Cry с N-концевой делецией α-спирали 1 и/или α-спирали 2, такие как Cry1A) из патентов США № 8304604 и 8304605, DIG-10 из патента США № US8697857; Cry1B из публикации заявки на патент США с серийным № 10/525318, публикации заявки на патент США № US20160194364 и патентов США № 9404121 и 8772577; варианты Cry1B из публикации согласно PCT с № WO2016/61197 и серийным № PCT/US17/27160; Cry1C из патента США № 6033874; Cry1F из патентов США № 518 8 960, 6218188; химеры Cry1AF из патентов США № 7070982; 6962705 и 6713063); белок Cry2, такой как белок Cry2Ab из патента США № 7064249); белок Cry3A, в том числе без ограничения созданный с помощью генной инженерии гибридный инсектицидный белок (eIP), полученный путем слияния уникальных комбинаций вариативных участков и консервативных блоков по меньшей мере двух различных белков Cry, таких как Cry3A с Cry1Aa или Cry1Ab (патенты США № US8309516 и US9522937); белок Cry4; белок Cry5; белок Cry6; белки Cry8 из патентов США № 7329736, 7449552, 7803943, 7476781, 7105332, 7339092, 7378499 и 7462760; белок Cry9, например представители семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F, в том числе белки Cry9 из патентов США 9000261 и 8802933 и патентного документа США с серийным № 62/287281; белок Cry15 из Naimov, et al., (2008) Applied and Environmental Microbiology 74:7145-7151; Cry22, белок Cry34Ab1 из патентов США № 6127180, 6624145 и 6340593; усеченный белок Cry34 из патента США № US8816157; белок CryET33 и CryET34 из патентов США № 6248535, 6326351, 6399330, 6949626, 7385107 и 7504229; гомологи CryET33 и CryET34 из публикации заявок на патент

США № 2006/0191034, 2012/0278954 и публикации согласно РСТ с № WO 2012/139004; белок Cry35Ab1 из патентов США № 6083499, 6548291 и 6340593; белок Cry46 из патента США № 9403881, белок Cry51, бинарный токсин Cry; TIC901 или родственный токсин; TIC807 из US 2008/0295207; TIC853 из патента США US8513493; ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127, TIC128 из РСТ US 2006/033867; сконструированные токсичные белки полужесткокрылых из публикации заявки на патент США № US20160150795; TIC1498, TIC1415, TIC1497, TIC1886, TIC1925, TIC1414, TIC1885, TIC1922, TIC1422, TIC 1974, TIC2032, TIC2120, TIC1362 из патента США US9238678; белок типа TIC2463 из публикации заявки на патент США № US20150274786; белок типа TIC3668 из публикации заявки на патент США № US20160319302; AXMI-027, AXMI-036 и AXMI-038 из патента США № 8236757; AXMI-031, AXMI-039, AXMI-040, AXMI-049 из US7923602; AXMI-018, AXMI-020 и AXMI-021 из WO 2006/083891; AXMI-010 из WO 2005/038032; AXMI-003 из WO 2005/021585; AXMI-008 из US 2004/0250311; AXMI-006 из US 2004/0216186; AXMI-007 из US 2004/0210965; AXMI-009 из US 2004/0210964; AXMI-014 из US 2004/0197917; AXMI-004 из US 2004/0197916; AXMI-028 и AXMI-029 из WO 2006/119457; AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080r2, AXMI-009, AXMI-014 и AXMI-004 из WO 2004/074462; AXMI-150 из патента США № 8084416; AXMI-205 из US20110023184; AXMI-011, AXMI-012, AXMI-013, AXMI-015, AXMI-019, AXMI-044, AXMI-037, AXMI-043, AXMI-033, AXMI-034, AXMI-022, AXMI-023, AXMI-041, AXMI-063 и AXMI-064 из US 2011/02 63488; AXMI-R1 и родственные белки из US 2010/0197592; AXMI221Z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z и AXMI225z из WO 2011/103248; AXMI218, AXMI219, AXMI220, AXMI226, AXMI227, AXMI228, AXMI229, AXMI230 и AXMI231 из патента США № US9156895; AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 и AXMI-184 из патента США № 8334431; AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 и AXMI-045 из US 2010/0298211; AXMI-066 и AXMI-076 из US2009/0144852; AXMI128, AXMI130, AXMI131, AXMI133, AXMI140, AXMI141, AXMI142, AXMI143, AXMI144, AXMI146, AXMI148, AXMI149, AXMI152, AXMI153, AXMI154, AXMI155, AXMI156, AXMI157, AXMI158, AXMI162, AXMI165, AXMI166, AXMI167, AXMI168, AXMI169, AXMI170, AXMI171, AXMI172, AXMI173, AXMI174, AXMI175, AXMI17 6, AXMI177, AXMI178, AXMI179, AXMI180, AXMI181, AXMI182, AXMI185, AXMI186, AXMI187, AXMI188, AXMI189 из патента США № 8318900; AXMI079, AXMI080, AXMI081, AXMI082, AXMI091, AXMI092, AXMI096, AXMI097, AXMI098, AXMI099, AXMI100, AXMI101, AXMI102, AXMI103, AXMI104, AXMI107, AXMI108, AXMI109, AXMI110, AXMI111, AXMI112, AXMI114, AXMI116, AXMI117, AXMI118, AXMI119, AXMI120, AXMI121, AXMI122, AXMI123, AXMI124, AXMI125, AXMI126, AXMI127, AXMI129, AXMI164, AXMI151, AXMI161, AXMI183, AXMI132, AXMI138, AXMI137 из US8461421; AXMI192 из патента США US8461415; AXMI234 и AXMI235 из публикации заявки на патент США № US20150218583; AXMI281 из публикации заявки на патент США № US20160177332; AXMI422 из патента США № US8252872; и белки Cry, такие как Cry1A и Cry3A, с модифицированными сайтами протеолитического расщепления из патента США № 8319019; модифицированный Cry3 из патента США № US9109231; и белок-токсин Cry1Ac, Cry2Aa и Cry1Ca из штамма VBTS 2528 *Bacillus thuringiensis* из публикации заявки на патент США № 2011/0064710. Белки Cry MP032, MP049, MP051, MP066, MP068, MP070, MP091S, MP109S, MP114, MP121, MP134S, MP183S, MP185S, MP186S, MP195S, MP197S, MP208S, MP209S, MP212S, MP214S, MP217S, MP222S, MP234S, MP235S, MP237S, MP242S, MP243, MP248, MP249S, MP251M, MP252S, MP253, MP259S, MP287S, MP288S, MP295S, MP296S, MP297S, MP300S, MP304S, MP306S, MP310S, MP312S, MP314S, MP319S, MP325S, MP326S, MP327S, MP328S, MP334S, MP337S, MP342S, MP349S, MP356S, MP359S, MP360S, MP437S, MP451S, MP452S, MP466S, MP468S, MP476S, MP482S, MP522S, MP529S, MP548S, MP552S, MP562S, MP564S, MP566S, MP567S, MP569S, MP573S, MP574S, MP575S, MP581S, MP590, MP594S, MP596S, MP597, MP599S, MP600S, MP601S, MP602S, MP604S, MP626S, MP629S, MP630S, MP631S, MP632S, MP633S, MP634S, MP635S, MP639S, MP640S, MP644S, MP649S, MP651S, MP652S, MP653S, MP661S, MP666S, MP672S, MP696S, MP704S, MP724S, MP729S, MP739S, MP755S, MP773S, MP799S, MP800S, MP801S, MP802S, MP803S, MP805S, MP809S, MP815S, MP828S, MP831S, MP844S, MP852, MP865S, MP879S, MP887S, MP891S, MP896S, MP898S, MP935S, MP968, MP989, MP993, MP997, MP1049, MP1066, MP1067, MP1080, MP1081, MP1200, MP1206, MP1233 и MP1311 из патентного документа США с серийным № 62/429426. Другие белки Cry хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на веб-сайте по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ к которому можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www"). Инсектицидная активность белков Cry хорошо известна специалисту в данной области техники (для обзора см. van Frannkenhuysen, (2009) *J. Invert. Path.* 101:1-16). Применение белков Cry в качестве признаков трансгенного растения хорошо известно специалисту в данной области техники, и трансгенные растения с Cry, в том числе без ограничения с Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A (патент США US7276583), Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A (патент США US7276583), Cry9c и CBI-Bt, были разрешены контролирующими органами (см. Sanahuja, (2011) *Plant Biotech Journal* 9:283-300 и CERA (2010) и базу данных ГМ растений центра по оценке риска для окружающей среды (CERA), Исследовательский фонд ILSI, г. Вашингтон на веб-сайте по адресу cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database, доступ к которым можно получить во

всемирной сети Интернет с применением приставки "www"). В растениях также может экспрессироваться два или больше пестицидных белков, хорошо известных специалисту в данной области техники, таких как Vip3Ab и Cry1Fa (US2012/0317682), Cry1BE и Cry1F (US2012/0311746), Cry1CA и Cry1AB (US2012/0311745), Cry1F и CryCa (US2012/0317681), Cry1DA и Cry1BE (US2012/0331590), Cry1DA и Cry1Fa (US2012/0331589), Cry1AB и Cry1BE (US2012/0324606), а также Cry1Fa и Cry2Aa, Cry1I или Cry1E (US2012/0324605). Пестицидные белки включают также инсектицидные липазы, в том числе ацилгидролазы липидов из патента США № 7491869 и холестерин-оксидазы, как, например, из Streptomyces (Purcell et al. (1993) Biochem Biophys Res Commun 15:140 6-1413). Пестицидные белки также включают токсины VIP (вегетативные инсектицидные белки) из патентов США № 5877012, 6107279, 6137033, 7244820, 7615686 и 8237020 и т. п. Другие белки VIP хорошо известны специалисту в данной области техники (см. веб-сайт по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с применением приставки "www"). Пестицидные белки также включают белки токсинового комплекса (ТС), которые можно получить из таких организмов, как Xenorhabdus, Photorhabdus и Paenibacillus (см. патенты США № 7491698 и 8084418). Некоторые ТС-белки обладают "самостоятельной" инсектицидной активностью, а другие ТС-белки повышают активность самостоятельных токсинов, вырабатываемых тем же указанным организмом. Токсичность "самостоятельного" ТС-белка (например, из Photorhabdus, Xenorhabdus или Paenibacillus) может повышаться с помощью одного или нескольких ТС-белков, "усилителей", полученных из организма-источника из другого рода. Существуют три основных типа ТС-белков. Как изложено в данном документе, белки класса А ("белок А") представляют собой самостоятельные токсины. Белки класса В ("белок В") и белки класса С ("белок С") повышают токсичность белков класса А. Примерами белков класса А являются TcbA, TcdA, XptA1 и XptA2. Примерами белков класса В являются TcaC, TcdB, XptB1Xb и XptC1Wi. Примерами белков класса С являются TccC, XptC1Xb и XptB1Wi. Пестицидные белки также включают белки яда пауков, змей и скорпионов. Примеры пептидов яда пауков включают без ограничения пептиды ликотоксин-1 и его мутантные формы (патент США № 8334366).

(С) Полинуклеотид, кодирующий специфичный в отношении насекомых гормон или феромон, такой как экидистероид и ювенильный гормон, его вариант, миметик на его основе или его антагонист или агонист. См., например, раскрытие Hammock, et al., (1990) Nature 344:458 бакуловирусной экспрессии клонированной эстеразы ювенильного гормона, инактиватора ювенильного гормона.

(D) Полинуклеотид, кодирующий специфичный в отношении насекомых пептид, который при экспрессии нарушает физиологию насекомого, на которого оказывают воздействие. Например, см. раскрытия Regan, (1994) J. Biol. Chem. 269:9 (экспрессионное клонирование приводит к ДНК, кодирующей рецептор диуретического гормона насекомых); Pratt, et al., (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (аллолатрин, обнаруженный у *Diptera punctata*);

Chattopadhyay, et al., (2004) Critical Reviews in Microbiology 30(1):33-54; Zjawiony, (2004) J Nat Prod 67(2):300-310; Carlini and Grossi-de-Sa, (2002) Toxicon 40(11):1515-1539; Ussuf, et al., (2001) Curr Sci. 80(7):847-853 и Vasconcelos and Oliveira, (2004) Toxicon 44 (4):385-403. См. также патент США № 5266317, Tomalski, et al., в котором раскрыты гены, кодирующие специфичные для насекомых токсины.

(E) Полинуклеотид, кодирующий фермент, ответственный за избыточное накопление монотерпена, сесквитерпена, стероида, гидроксамовой кислоты, производного фенилпропаноида или другой небелковой молекулы с инсектицидной активностью.

(F) Полинуклеотид, кодирующий фермент, вовлеченный в модификацию, в том числе посттрансляционную модификацию, биологически активной молекулы; например гликолитический фермент, протеолитический фермент, липолитический фермент, нуклеаза, циклаза, трансминаза, эстераза, гидролаза, фосфатаза, киназа, фосфоорилаза, полимеразы, эластаза, хитиназа и глюканаза, либо натуральные, либо синтетические. См. заявку согласно РСТ WO 1993/02197 на имя Scott, et al., в которой раскрыта нуклеотидная последовательность гена каллазы. Молекулы ДНК, которые содержат последовательности, кодирующие хитиназу, можно получить, например, из ATCC® под номерами доступа 39637 и 67152. См. также Kramer, et al., (1993) Insect Biochem. Molec. Biol. 23:691, в которой содержатся сведения о нуклеотидной последовательности кДНК, кодирующей хитиназу табачного бражника, и Kawalleck, et al., (1993) Plant Molec. Biol. 21:673, в которой предложена нуклеотидная последовательность гена полиубиквитина ubi4-2 петрушки, и патенты США № 6563020; 7145060 и 7087810.

(G) Полинуклеотид, кодирующий молекулу, которая стимулирует сигнальную трансдукцию. Например, см. раскрытие в Botella, et al., (1994) Plant Molec. Biol. 24:757, касающееся нуклеотидных последовательностей клонов кДНК кальмодулина из фасоли золотистой, и Griess, et al., (1994) Plant Physiol. 104:1467, в которой представлена нуклеотидная последовательность клона кДНК кальмодулина маиса.

(H) Полинуклеотид, кодирующий пептид с гидрофобным моментом. См. заявку согласно РСТ WO 1995/16776 и патент США № 5580852, раскрывающие пептидные производные тахиплезина, которые подавляют грибковые патогены растений, и заявку согласно РСТ WO 1995/18855, а также патент США № 5607914 (в котором раскрыты синтетические противомикробные пептиды, которые придают устойчивость к заболеваниям).

(I) Полинуклеотид, кодирующий мембранную пермеазу, каналобразователь или блокатор каналов.

Например, см. раскрытие в Jaynes, et al., (1993) *Plant Sci.* 89:43 гетерологичной экспрессии аналога цекропин-бета литического пептида для придания трансгенным растениям табака устойчивости к *Pseudomonas solanacearum*.

(J) Ген, кодирующий вирусный инвазивный белок или сложный токсин, полученный из него. Например, накопление белков вирусной оболочки в трансформированных растительных клетках придает устойчивость к вирусной инфекции и/или развитию заболевания, вызванного вирусом, из которого получен ген белка оболочки, а также родственными вирусами. См. Beachy, et al., (1990) *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451. Устойчивость, опосредованную белком оболочки, придавали трансформированным растениям в отношении вируса мозаики люцерны, вируса мозаики огурца, вируса полосатости табака, вируса X картофеля, вируса Y картофеля, вируса гравировки табака, вируса погремковости табака и вируса табачной мозаики. Там же.

(K) Ген, кодирующий антитело, специфичное в отношении насекомого, или полученный из него иммунотоксин. Таким образом, антитело, нацеленное на критическую метаболическую функцию в кишечнике насекомого, будет инактивировать фермент, на который оказывается воздействие, с уничтожением насекомого. См. также Taylor, et al., Abstract #497, SEVENTH INT'L SYMPOSIUM ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS (Эдинбург, Шотландия, 1994) (ферментативная инактивация в трансгенном табаке посредством выработки одноцепочечных фрагментов антител).

(L) Ген, кодирующий антитело, специфичное в отношении вируса. См., например, Tavloraki, et al., (1993) *Nature* 366:469, где показано, что трансгенные растения, экспрессирующие гены рекомбинантного антитела, защищены от поражения вирусом.

(M) Полинуклеотид, кодирующий белок, останавливающий развитие, вырабатываемый в природе патогеном или паразитом. Таким образом, грибные эндо-альфа-1,4-D-полигалактуроназы облегчают грибную колонизацию и высвобождение питательных веществ для растений путем солибилизации гомо-альфа-1,4-D-галактуроназы клеточной стенки растения. См. Lamb, et al., (1992) *Bio/Technology* 10:1436. Клонирование и определение характеристик гена, который кодирует белок, подавляющий эндополигалактуроназу бобов, описан в Toubart, et al., (1992) *Plant J.* 2:367.

(N) Полинуклеотид, кодирующий белок, останавливающий развитие, вырабатываемый в природе растением. Например, Logemann, et al., (1992) *Bio/Technology* 10:305 показали, что трансгенные растения, экспрессирующие ген ячменя, инактивирующий рибосомы, обладали повышенной устойчивостью к грибковым заболеваниям.

(O) Гены, вовлеченные в реакцию системной приобретенной устойчивости (SAR) и/или гены, связанные с патогенезом. Briggs, (1995) *Current Biology* 5(2), Pieterse and Van Loon, (2004) *Curr. Opin. Plant Bio.* 7(4):456-64, и Somssich, (2003) *Cell* 113 (7):815-6.

(P) Противогрибковые гены (Cornelissen and Melchers, (1993) *Pl. Physiol.* 101:709-712, и Parijs, et al., (1991) *Planta* 183:258-264, и Bushnell, et al., (1998) *Can. J. of Plant Path.* 20(2):137-149. Также см. публикации заявок на патенты США с серийными № 09/950933; 11/619645; 11/657710; 11/748994; 11/774121 и патенты США № 6891085 и 7306946. Киназы, подобные рецептору LysM, для распознавания фрагментов хитина, как первая стадия в защитной реакции растения в отношении грибков-патогенов (US 2012/0110696).

(Q) Гены системы детоксикации, такие как кодирующие фумонизин, беауверин, монилиформин и зеараленон и их структурно родственные производные. Например, см. патенты США № 5716820; 5792931; 5798255; 5846812; 6083736; 6538177; 6388171 и 6812380.

(R) Полинуклеотид, кодирующий цистатин и ингибиторы цистеинпротеиназы. См. патент США № 7205453.

(S) Гены дефензинов. См. WO 2003/000863 и патенты США № 6911577; 6855865; 6777592 и 7238781.

(T) Гены, обеспечивающие устойчивость к нематодам. См., например, заявку согласно PCT WO 1996/30517; заявку согласно PCT WO 1993/19181, WO 2003/033651 и Urwin, et al., (1998) *Planta* 204:472-479, Williamson, (1999) *Curr Opin Plant Bio.* 2(4):327-31; патенты США № 6284948 и 7301069 и гены miR164 (WO 2012/058266).

(U) Гены, которые обеспечивают устойчивость к корневой гнили, вызываемой *Phytophthora*, такие как Rps 1, Rps 1-a, Rps 1-b, Rps 1-c, Rps 1-d, Rps 1-e, Rps 1-k, Rps 2, Rps 3-a, Rps 3-b, Rps 3-c, Rps 4, Rps 5, Rps 6, Rps 7 и другие гены Rps. См., например, Shoemaker, et al., *Phytophthora Root Rot Resistance Gene Mapping in Soybean*, Plant Genome IV Conference, San Diego, Calif. (1995).

(V) Гены, которые обеспечивают устойчивость к бурой стеблевой гнили, такие как описаны в патенте США № 5689035, включенном посредством ссылки для данной цели.

(W) Гены, которые обеспечивают устойчивость к *Colletotrichum*, такие как описанные в публикации заявки на патент США US 2009/0035765, включенной посредством ссылки для данной цели. Они включают locus Rcg, который можно использовать как конверсию одного локуса.

2) Трансгены, которые обеспечивают устойчивость к гербициду, например, приведенные ниже.

(A) Полинуклеотид, кодирующий устойчивость к гербициду, который подавляет образование конуса нарастания или меристемы, такому как имидазолинон или сульфонилмочевина. Иллюстративные гены

в этой категории кодируют мутантный фермент ALS и AHAS, как описано, например, соответственно у Lee, et al., (1988) EMBO J. 7:1241 и Miki, et al., (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449. См. также патенты США № 5605011; 5013659; 5141870; 5767361; 5731180; 5304732; 4761373; 5331107; 5928937 и 5378824; заявку на патент США с серийным № 11/683737 и публикацию международной заявки WO 1996/33270.

(B) Полинуклеотид, кодирующий белок для устойчивости к глифосату (устойчивость придают мутантные гены 5-енолприурил-3-фосфошжиматсинтазы (EPSP) и agoA соответственно), и другим фосфовым соединениям, таким как глюфосинат (гены фосфинотрицинацетилтрансферазы (PAT) и фосфинотрицинацетилтрансферазы (bar) *Streptomyces hygrosopicus*), и пиридинокси- или феноксипропионовым кислотам и циклогексонам (гены, кодирующие ингибитор АССазы). См., например, патент США № 4940835, Shah, et al., в котором раскрыта нуклеотидная последовательность формы EPSPS, которая может придавать устойчивость к глифосату. В патенте США № 5627061, Vargy, et al., также описаны гены, кодирующие ферменты EPSPS. См. также патенты США № 6566587; 6338961; 6248876; 6040497; 5804425; 5633435; 5145783; 4971908; 5312910; 5188642; 5094945, 4940835; 5866775; 6225114; 6130366; 5310667; 4535060; 4769061; 5633448; 5510471; Re. 36449; RE 37287 E и 5491288 и публикации международных заявок EP 1173580; WO 2001/66704; EP 1173581 и EP 1173582, которые включены в данный документ посредством ссылки для данной цели. Устойчивость к глифосату также придается растениям, которые экспрессируют ген, кодирующий фермент глифосат-оксидоредуктазу, как более подробно описано в патентах США № 5776760 и 5463175, которые включены в данный документ для данной цели посредством ссылки. Кроме того, устойчивость к глифосату может придаваться растениям посредством сверхэкспрессии генов, кодирующих глифосат-N-ацетилтрансферазу. См., например, патенты США № 7462481; 7405074 и публикацию заявки на патент США № US 2008/0234130. Молекулу ДНК, кодирующую мутантный ген agoA, можно получить под номером доступа ATCC® 39256, а нуклеотидная последовательность мутантного гена раскрыта в патенте США № 4769061, выданном Comai. В заявке EP № 0333033, выданном Kumada, et al. и патенте США № 4975374, выданном Goodman, et al., раскрыты нуклеотидные последовательности генов глутаминсинтетазы, придающие устойчивость к гербицидам, таким как L-фосфинотрицин. Нуклеотидная последовательность гена фосфинотрицинацетилтрансферазы представлена в заявках EP № 0242246 и 0242236, Leemans, et al., De Greef, et al., (1989) Bio/Technology 7:61, где описано получение трансгенных растений, которые экспрессируют химерные гены bar, кодирующие фосфинотрицинацетилтрансферазную активность. См. также патенты США № 5969213; 5489520; 5550318; 5874265; 5919675; 5561236; 5648477; 5646024; 6177616 и 5879903, которые включены в данный документ для данной цели посредством ссылки. Иллюстративные гены, придающие устойчивость к феноксипропионовым кислотам и циклогексонам, таким как сетоксидим и галоксифоп, представляют собой гены Acc1-S1, Acc1-S2 и Acc1-S3, описанные у Marshall, et al., (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Полинуклеотид, кодирующий белок, обеспечивающий устойчивость к гербициду, который подавляет фотосинтез, такому как триазин (гены psbA и gs+) и бензонитрил (ген нитрилазы). Przibilla, et al., (1991) Plant Cell 3:169 описывают трансформацию *Chlamydomonas* с помощью плазмид, кодирующих мутантные гены psbA. Нуклеотидные последовательности генов нитрилазы раскрыты в патенте США № 4810648, выданном Stalker, и молекулы ДНК, содержащие эти гены, доступны под номерами доступа ATCC® 53435, 67441 и 67442. Клонирование и экспрессия ДНК, кодирующей глутатион-S-трансферазу, описаны у Hayes, et al., (1992) Biochem. J. 285:173.

(D) В ряд растений был введен полинуклеотид, кодирующий белок, обеспечивающий устойчивость к синтазе ацетогидроксикислот, которая, как было обнаружено, делает растения, которые экспрессируют данный фермент, устойчивыми к нескольким типам гербицидов (см., например, Hattori, et al., (1995) Mol Gen Genet. 246:419). Другие гены, которые придают устойчивость к гербицидам, включают в себя ген, кодирующий химерный белок цитохрома P4507A1 крысы и NADPH-цитохром-P450-оксидоредуктазы дрожжей (Shiota, et al., (1994) Plant Physiol 106:17), гены, кодирующие глутатионредуктазу и супероксиддисмугтазу (Aono, et al., (1995) Plant Cell Physiol 36:1687), и гены, кодирующие различные фосфотрансферазы (Datta, et al., (1992) Plant Mol Biol 20:619).

(E) Полинуклеотид, кодирующий устойчивость к гербициду, целенаправленно воздействующему на протопорфириногенаоксидазу (protox), которая необходима для выработки хлорофилла. Фермент protox служит в качестве мишени для ряда гербицидных соединений. Эти гербициды также подавляют рост всех присутствующих различных видов растений, вызывая их полное разрушение. Разработка растений, характеризующихся измененной protox-активностью, которые устойчивы к этим гербицидам, описана в патентах США № 6288306; 628283 и 5767373 и публикации международной заявки WO2001/12825.

(F) Ген aad-1 (изначально из *Sphingobium herbicidovorans*) кодирует белок арилоксиалканоксидогеназу (AAD-1). Признак обеспечивает переносимость гербицидов на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и арилоксифеноксипропионата (обычно называемых "фоп"-гербициды, таких как квизалофоп). Ген aad-1, как таковой, обеспечивающий переносимость гербицида у растений, впервые был раскрыт в WO 2005/107437 (см. также US 2009/0093366). Ген aad-12, полученный от *Delftia acidovorans*, который кодирует белок арилоксиалканоксидогеназу (AAD-12), приводящий к переносимости гербицидов на основе 2,4-

дихлорфеноксиуксусной кислоты и пиридилоксиацетата путем инактивации некоторых гербицидов с арилоксиалканоатным фрагментом, в том числе фенокси-ауксина (например, 2,4-D, MCPA), а также видов пиридилокси-ауксина (например, флуороксипира, триклопира).

(G) Полинуклеотид, кодирующий устойчивую к гербициду дикамба-монооксигеназу, раскрытый в публикации заявки на патент США 2003/0135879, для придания переносимости дикамбы.

(H) Полинуклеотидная молекула, кодирующая бромоксиинилнитрилазу (Bxn), раскрытая в патенте США № 4810648, для придания переносимости бромоксинила.

(I) Полинуклеотидная молекула, кодирующая фитоен (crtl), описанный у Misawa, et al., (1993) Plant J. 4:833-840 и у Misawa, et al., (1994) Plant J. 6:481-489, для переносимости норфлуразона.

3) Трансгены, которые обеспечивают измененные характеристики зерна или вносят в них вклад. Например.

(A) Измененное содержание жирных кислот, например, с помощью приведенного ниже.

(1) Подавления стеароил-АСР для повышения содержания стеариновой кислоты в растении. См. Knultzon, et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2624 и WO 1999/64579 (Genes to Alter Lipid Profiles in Corn).

(2) Повышения содержания олеиновой кислоты посредством модификации гена FAD-2 и/или снижения содержания линоленовой кислоты посредством модификации гена FAD-3 (см. патенты США № 6063947; 6323392; 6372965 и WO 1993/11245).

(3) Изменения содержания конъюгированных линоленовой или линолевой кислоты, как, например, в WO 2001/12800.

(4) Изменения LEC1, AGP, Dek1, Superall, mil ps и различных генов Ipa, таких как Ipa1, Ipa3, hpt или hgt. Например, см. WO 2002/42424, WO 1998/22604, WO 2003/011015, WO 2002/057439, WO 2003/011015, патенты США № 6423886, 6197561, 6825397 и публикации заявок на патенты США № US 2003/0079247, US 2003/0204870 и Rivera-Madrid, et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:5620-5624.

(5) Генов, кодирующих дельта-8-десатуразу для получения длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (патенты США № 8058571 и 8338152), дельта-9 десатуразу для снижения содержания насыщенных жиров (патент США № 8063269), Δ6-десатуразу примулы для улучшения профилей омега-3 жирных кислот.

(6) Выделенных нуклеиновых кислот и белков, ассоциированных с регуляцией метаболизма липидов и сахаров, в частности белка липидного метаболизма (LMP), применяемых в способах получения трансгенных растений и модуляции уровней запасных веществ семени, в том числе липидов, жирных кислот, видов крахмала или запасных белков семени, и их применения в способах модуляции размера семени, количества семян, веса семян, длины корней и размера листьев растений (EP 2404499).

(7) Изменения экспрессии белка с высоким уровнем экспрессии, индуцируемого сахарами 2 (HSI2), в растении для повышения или снижения экспрессии HSI2 в растении. Повышение экспрессии HSI2 повышает содержание масла, тогда как понижение экспрессии HSI2 снижает восприимчивость к абсцизовой кислоте и/или повышает устойчивость к засухе (публикация заявки на патент США № 2012/0066794).

(8) Экспрессии цитохрома b5 (Cb5) отдельно или вместе с FAD2 для модуляции содержания масла в семени растения, в частности для повышения уровней омега-3 жирных кислот и улучшения соотношения омега-6 и омега-3 жирных кислот (публикация заявки на патент США № 2011/0191904).

(9) Молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих wrinkledl-подобные полипептиды для модуляции метаболизма сахаров (патент США № 8217223).

(B) Измененное содержание фосфора, например, с помощью приведенного ниже.

(1) Введения гена, кодирующего фитазу, при этом будет улучшаться распад фитата, что приводит к большему количеству свободного фосфата в трансформированном растении. Например, см. Van Hartingsveldt, et al., (1993) Gene 127:87 относительно раскрытия нуклеотидной последовательности гена фитазы *Aspergillus niger*.

(2) Модуляции гена, который снижает содержание фитата. У маиса это можно осуществлять, например, с помощью клонирования, а затем повторного введения ДНК, ассоциированной с одним или несколькими аллелями, такими как аллели LPA, обнаруженные у мутантов маиса, характеризующихся низкими уровнями фитиновой кислоты, как, например, в WO 2005/113778, и/или посредством изменения активности инозитолкиназы, как в WO 2002/059324, публикации заявки на патент США № 2003/0009011, WO 2003/027243, публикации заявки на патент США № 2003/0079247, WO 1999/05298, патенте США № 6197561, патенте США № 6291224, патенте США № 6391348, WO 2002/059324, публикации заявки на патент США № 2003/0079247, WO 1998/45448, WO 1999/55882, WO 2001/04147.

(C) Измененные углеводы, на которые воздействовали, например, путем изменения гена, кодирующего фермент, который воздействует на паттерн ветвления крахмала, или гена, изменяющего тиоредоксин, такого как NTR и/или TRX (см. патент США № 653164 8, который включен для данной цели посредством ссылки), и/или нокаута гамма-зеина или использования мутанта, такого как cs27, или TUSC27, или en27 (см. патент США № 6858778 и публикацию заявки на патент США № 2005/0160488, публикацию заявки на патент США № 2005/0204418, которые включены для данной цели посредством ссылки).

См. Shiroza, et al., (1988) *J. Bacteriol.* 170:810 (нуклеотидная последовательность мутантного гена фруктозилтрансферазы *Streptococcus*), Steinmetz, et al., (1985) *Mol. Gen. Genet.* 200:220 (нуклеотидная последовательность гена левансахаразы *Bacillus subtilis*), Pen, et al., (1992) *Bio/Technology* 10:292 (получение трансгенных растений, которые экспрессируют альфа-амилазу *Bacillus licheniformis*), Elliot, et al., (1993) *Plant Molec. Biol.* 21:515 (нуклеотидные последовательности генов инвертазы томата), SØgaard, et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22480 (сайт-направленный мутагенез гена альфа-амилазы ячменя) и Fisher, et al., (1993) *Plant Physiol.* 102:1045 (фермент II ветвления крахмала эндосперма маиса), WO 1999/10498 (улучшенная усвояемость и/или извлечение крахмала путем модификации UDP-D-ксилоза 4-эпимеразы, *Fragile 1* и *2*, Ref1, HCNH, C4H), патент США № 6232529 (способ получения семян с высоким содержанием масла путем модификации уровней крахмала (AGP)). Гены модификации жирных кислот, упомянутые в данном документе, можно применять также для воздействия на содержание и/или состав крахмала благодаря взаимосвязи путей метаболизма крахмала и масла.

(D) Измененное содержание или состав антиоксидантов, как, например, изменение токоферола или токотриенолов. Например, см. патент США № 6787683, публикацию заявки на патент США № 2004/0034886 и WO 2000/68393, предусматривающую манипуляцию с уровнями антиоксидантов, и WO 2003/082899, благодаря изменению гомогенизатгеранилгеранилтрансферазы (*hgg*).

(E) Измененное содержание незаменимых аминокислот в семени. Например, см. патент США № 6127600 (способ повышения накопления незаменимых аминокислот в семенах), патент США № 6080913 (бинарные способы повышения накопления незаменимых аминокислот в семенах), патент США № 5990389 (высокое содержание лизина), WO 1999/40209 (изменение аминокислотного состава семян), WO 1999/29882 (способы изменения аминокислотного состава белков), патент США № 5850016 (изменение аминокислотного состава семян), WO 1998/20133 (белки с повышенными уровнями незаменимых аминокислот), патент США № 5885802 (высокое содержание метионина), патент США № 5885801 (высокое содержание треонина), патент США № 6664445 (растительные ферменты биосинтеза аминокислот), патент США № 6459019 (повышенное содержание лизина и треонина), патент США № 6441274 (бета-субъединица растительной триптофансинтазы), патент США № 6346403 (ферменты метаболизма метионина), патент США № 5939599 (высокое содержание серы), патент США № 5912414 (повышенное содержание метионина), WO 1998/56935 (растительные ферменты биосинтеза аминокислот), WO 1998/45458 (разработанный с помощью генной инженерии белок семени, имеющий более высокую процентную долю незаменимых аминокислот), WO 1998/42831 (повышенное содержание лизина), патент США № 5633436 (повышение содержания серосодержащих аминокислот), патент США № 5559223 (синтетические запасные белки с определенной структурой, содержащие программируемые уровни незаменимых аминокислот для улучшения питательной ценности растений), WO 1996/01905 (повышенное содержание треонина), WO 1995/15392 (повышенное содержание лизина), публикацию заявки на патент США № 2003/0163838, публикацию заявки на патент США № 2003/0150014, публикацию заявки на патент США № 2004/0068767, патент США № 6803498, WO 2001/79516.

4) Гены, контролирующие мужскую стерильность.

Доступно несколько способов обеспечения генетической мужской стерильности, как, например, несколько мутантных генов в отдельных положениях в пределах генома, которые придают мужскую стерильность, как раскрыто в патентах США № 4654465 и 4727219, Brag, et al., и хромосомные транслокации, как описано Patterson в патенте США № 3861709 и 3710511. В дополнение к этим способам, Albertsen, et al. в патенте США № 5432068 описывают систему ядерной мужской стерильности, которая включает: идентификацию гена, который крайне важен для мужской фертильности; сайленсинг этого нативного гена, который крайне важен для мужской фертильности; удаление нативного промотора из гена, важного для мужской фертильности, и замещение его на индуцируемый промотор; вставку этого полученного с помощью генной инженерии гена обратно в растение, и таким образом создание растения, которое характеризуется мужской стерильностью, поскольку индуцируемый промотор не "включен", в результате чего ген мужской фертильности не транскрибируется. Фертильность восстанавливают посредством индуцирования или "включения" промотора, который, в свою очередь, осуществляет транскрипцию гена, обеспечивающего мужскую фертильность.

(A) Введение гена деацетилазы под управлением промотора, специфичного в отношении тапетума, и с применением химического N-Ас-PPT (WO 2001/29237).

(B) Введение различных промоторов, специфичных в отношении тычинок (WO 1992/13956, WO 1992/13957).

(C) Введение барназы и гена барстара (Paul, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 19:611-622).

Дополнительные примеры систем и генов ядерной мужской и женской стерильности см. также в патентах США № 5859341; 6297426; 5478369; 5824524; 5850014 и 6265640, все из которых тем самым включены посредством ссылки.

5) Гены, которые создают сайт для сайт-специфичной интеграции ДНК.

Подразумевается введение сайтов FRT, которые можно применять в системе FLP/FRT, и/или сайтов Lox, которые можно применять в системе Cre/Lox. Например, см. Lyznik, et al., (2003) *Plant Cell Rep* 21:925-932 и WO 1999/25821, которые тем самым включены посредством ссылки. Другие системы, кото-

рые можно применять, включают рекомбиназу Gin из фага Mu (Maeser, et al., (1991) Vicki Chandler, The Maize Handbook ch. 118 (Springer- Verlag 1994), рекомбиназу Pin из E. coli (Enomoto, et al., 1983) и систему R/RS из плазмиды pSRi (Araki, et al., 1992).

б) Гены, которые воздействуют на устойчивость к абиотическому стрессу.

В том числе без ограничений на цветение, развитие початка и семени, улучшение эффективности использования азота, измененную реактивность в отношении азота, устойчивость к засухе или ее переносимость, устойчивость к холоду или его переносимость, а также устойчивость к засолению или ее переносимость и повышенную урожайность при стрессе.

(А) Например, см. WO 2000/73475, где эффективность использования воды изменена благодаря изменению содержания малата; патенты США № 5892009, 5965705, 5929305, 5891859, 6417428, 6664446, 6706866, 6717034, 6801104, WO 2000/060089, WO 2001/026459, WO 2001/035725, WO 2001/034726, WO 2001/035727, WO 2001/036444, WO 2001/036597, WO 2001/036598, WO 2002/015675, WO 2002/017430, WO 2002/077185, WO 2002/079403, WO 2003/013227, WO 2003/013228, WO 2003/014327, WO 2004/031349, WO 2004/076638, WO 199809521.

(В) WO 199938977, в которой описаны гены, в том числе гены CBF, и факторы транскрипции, эффективные в ослаблении отрицательных эффектов замораживания, высокого содержания солей и засухи на растения, а также обеспечивающие другие положительные эффекты в отношении фенотипа растения.

(С) Публикация заявки на патент США № 2004/0148654 и WO 2001/36596, где в растениях изменяют содержание абсцизовой кислоты, что приводит к улучшенному фенотипу растения, такому как повышенная урожайность и/или повышенная переносимость абиотического стресса.

(D) WO 2000/006341, WO 2004/090143, патенты США № 7531723 и 6992237, где экспрессия цитокинина модифицируется, что приводит к растениям с повышенной переносимостью стрессов, как, например, переносимостью засухи и/или повышенной урожайностью. Также см. WO 2002/02776, WO 2003/052063, JP 2002/281975, патент США № 6084153, WO 2001/64898, патент США № 6177275 и патент США № 6107547 (улучшение использования азота и измененная реактивность в отношении азота).

(Е) Что касается изменения содержания этилена, см. публикацию заявки на патент США № 2004/0128719, публикацию заявки на патент США № 2003/0166197 и WO 2000/32761.

(F) Что касается растительных факторов транскрипции или транскрипционных регуляторов, связанных с реакцией на абиотический стресс, см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0098764 или публикацию заявки на патент США № 2004/0078852.

(G) Гены, которые повышают экспрессию вакуолярной пирофосфатазы, такие как AVP1 (патент США № 8058515), для повышенной урожайности; нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды HSFA4 или HSFA5 (фактор теплового шока класса A4 или A5), полипептид, подобный белку транспортера олигопептидов (OPT4-подобный); пластохрон-2-подобный (PLA2-подобный) полипептид или Wuschel-родственный гомеобокс 1-подобный (WOX1-подобный) полипептид (публикация заявки на патент США № US 2011/0283420).

(H) Подавление полинуклеотидов, кодирующих белки поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) для модуляции запрограммированной клеточной смерти (патент США № 8058510), для повышения мощности.

(I) Полинуклеотид, кодирующий полипептиды DTP21, для обеспечения устойчивости к засухе (публикация заявки на патент США № US 2011/02 77181).

(J) Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки ACC синтазы 3 (ACS3), для модуляции развития, модуляции реакции на стресс и модуляции переносимости стрессов (публикация заявки на патент США № US 2010/0287669).

(K) Полинуклеотиды, кодирующие белки, которые приводят к фенотипу переносимости засухи (DTP), для обеспечения устойчивости к засухе (WO 2012/058528).

(L) Гены токоферолциклазы (TC) для обеспечения переносимости засухи и засоления (публикация заявки на патент США № 2012/0272352).

(M) Белки семейства протеаз, нацеленные на СААХ-концевые аминокислоты, для придания переносимости стрессов (патент США № 8338661).

(N) Мутации в гене, кодирующем SAL1, характеризовались повышенной переносимостью стрессов, в том числе характеризовались повышенной устойчивостью к засухе (публикация заявки на патент США № 2010/0257633).

(O) Экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из: полипептида GRF, RAA1-подобного полипептида, полипептида SYR, полипептида ARKL и полипептида YTP, усиливающих признаки, связанные с урожайностью (публикация заявки на патент США № 2011/0061133).

(P) Модуляция экспрессии в растении нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид трегалоза-фосфатфосфатазу (TRP) класса III для улучшения у растений признаков, связанных с урожайностью, в частности повышения урожайности семян (публикация заявки на патент США № 2010/0024067).

Другие гены и факторы транскрипции, которые воздействуют на рост и агрономические признаки растений, такие как урожайность, цветение, рост растения и/или структура растения, можно вводить или

интрогрессировать в растения, см., например, WO 1997/49811 (LHY), WO 1998/56918 (ESD4), WO 1997/10339 и патент США № 6573430 (TFL), патент США № 6713663 (FT), WO 1996/14414 (CON), WO 1996/38560, WO 2001/21822 (VRN1), WO 2000/44918 (VRN2), WO 1999/49064 (GI), WO 2000/46358 (FR1), WO 1997/29123, патент США № 6794560, патент США № 6307126 (GAI), WO 1999/09174 (D8 и Rht) и WO 2004/076638, а также WO 2004/031349 (факторы транскрипции).

7) Гены, которые обеспечивают повышенную урожайность.

(A) Трансгенное культурное растение, трансформированное с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаза-подобный полипептид (ACCDP), где экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты в культурном растении приводит к повышенному росту корней, и/или повышенной урожайности, и/или повышенной переносимости стрессов под влиянием факторов среды у растения, по сравнению с разновидностью дикого типа растения (патент США № 8097769).

(B) Как было показано, сверхэкспрессия гена белков "цинковых пальцев" маиса (Zm-ZFP1) с применением промотора, активного преимущественно в семенах, усиливает рост растения, увеличивает количество зерен и общий вес зерен на растение (публикация заявки на патент США № 2012/0079623).

(C) Как было показано, конститутивная сверхэкспрессия белка с доменом границ латеральных органов (LOB) (Zm-LOBDP1) маиса увеличивает количество зерен и общий вес зерен на растение (публикация заявки на патент США № 2012/0079622).

(D) Улучшение у растений признаков, связанных с урожайностью, с помощью модуляции экспрессии у растения нуклеиновой кислоты, кодирующей VIM1 (вариант с метилированием 1)-подобный полипептид, или VTC2-подобный (GDP-L-галактоза-фосфорилаза) полипептид, или полипептид DUF1685, или ARF6-подобный (восприимчивый к ауксину фактор) полипептид (WO 2012/038893).

(E) Модуляция экспрессии в растении нуклеиновой кислоты, кодирующей Ste20-подобный полипептид или его гомолог, позволяет растениям обеспечивать повышенную урожайность относительно контрольных растений (EP 2431472).

(F) Гены, кодирующие полипептиды нуклеозидифосфаткиназы (NDK) и их гомологи для модификации строения корня растения (публикация заявки на патент США № 2009/0064373).

8) Гены, которые обеспечивают усвояемость растения.

(A) Изменение уровня ксилана, присутствующего в клеточной стенке растения, с помощью модуляции экспрессии ксилансинтазы (патент США № 8173866).

В некотором варианте осуществления пакетированный признак может представлять собой признак или трансгенный объект, который получил разрешение контролирующих органов, в том числе без ограничения трансгенные объекты, одобренные контролируемыми органами, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, и их можно найти на веб-сайте Центра оценки риска для окружающей среды (seca-gmc.org/?action=gm_stop_database, доступ к которому можно получить с применением приставки www) и на вебсайте Международной службы по приобретению агробιοтехнологических приложений (isa.org/gmapprovaldatabase/default.asp, доступ к которому можно получить с применением приставки www).

Сайленсинг генов.

В некоторых вариантах осуществления пакетированный признак может быть в форме, применимой для сайленсинга одного или нескольких полинуклеотидов, представляющих интерес, что приводит к супрессии одного или нескольких целевых полипептидов вредителя. В некоторых вариантах осуществления сайленсинг достигается благодаря применению супрессионной ДНК-конструкции.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько полинуклеотидов, кодирующих полипептиды полипептида IPD090 или их фрагментов или вариантов, могут быть пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими один или несколько полипептидов, характеризующихся инсектицидной активностью или агрономическими признаками, изложенными выше, и необязательно могут дополнительно предусматривать один или несколько полинуклеотидов, предусмотренных для сайленсинга генов одного или нескольких целевых полинуклеотидов, которые обсуждаются ниже.

"Супрессионная ДНК-конструкция" представляет собой рекомбинантную ДНК-конструкцию, которая при трансформации или стабильной интеграции в геном растения приводит в результате к "сайленсингу" целевого гена в растении. Целевой ген может быть эндогенным или трансгенным по отношению к растению. Термин "сайленсинг", используемый в данном документе в отношении целевого гена, обычно относится к обеспечению супрессии уровней мРНК или белка/фермента, экспрессируемых целевым геном, и/или уровня активности фермента или функционирования белка. Термин "супрессия" включает понижение, снижение, ухудшение, уменьшение, подавление, устранение и предотвращение. "Сайленсинг" или "сайленсинг генов" не определяет механизм и включают без ограничения супрессию, опосредованную антисмысловыми олигонуклеотидами, косупрессию, супрессию, опосредованную вирусами, супрессию, опосредованную шпильками, супрессию, опосредованную структурами типа "стебель-петля", подходы на основе RNAi и подходы на основе низкомолекулярных РНК.

Супрессионная ДНК-конструкция может содержать участок, происходящий от целевого гена, представляющего интерес, и может содержать всю или часть последовательности нуклеиновой кислоты смы-

словой нити (или антисмысловой нити) целевого гена, представляющего интерес. В зависимости от подхода, который будет использоваться, участок может быть на 100% идентичным или менее, чем на 100% идентичным (например, по меньшей мере на 50% или на любое целое число от 51 до 100% идентичным) всей смысловой нити (или антисмысловой нити) гена, представляющего интерес, или ее части.

Супрессионные ДНК-конструкции хорошо известны в данной области, легко конструируются сразу после выбора целевого гена, представляющего интерес, и включают без ограничения косупрессионные конструкции, антисмысловые конструкции, вирусные супрессионные конструкции, шпильковые супрессионные конструкции, супрессионные конструкции типа "стебель-петля", конструкции, вырабатывающие двухнитевые РНК, и в более общем смысле конструкции для RNAi (РНК-интерференции) и конструкции на основе небольших РНК, такие как конструкции на основе siRNA (коротких интерферирующих РНК) и miRNA (микроРНК).

Термин "антисмысловое подавление" относится к продуцированию антисмысловых РНК-транскриптов, способных обеспечивать супрессию экспрессии целевого белка.

Термин "антисмысловая РНК" относится к РНК-транскрипту, который комплементарен всему целевому первичному транскрипту или мРНК или их части, и который блокирует экспрессию фрагмента целевой выделенной нуклеиновой кислоты. Комплементарность антисмысловой РНК может быть с любой частью конкретного генного транскрипта, т.е. с 5'-некодирующей последовательностью, 3'-некодирующей последовательностью, интронами или кодирующей последовательностью.

Термин "косупрессия" относится к продуцированию смысловых РНК-транскриптов, способных обеспечивать супрессию экспрессии целевого белка. Термин "смысловая" РНК относится к РНК-транскрипту, который включает мРНК и может быть транслирован с образованием белка в клетке или *in vitro*. Конструкции для косупрессии у растений ранее разрабатывались с основным вниманием, сосредоточенным на сверхэкспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, имеющих гомологию с нативной мРНК, в смысловой ориентации, что приводит к снижению уровней всех РНК, имеющих гомологию со сверхэкспрессированной последовательностью (см. Vaucheret, et al., (1998) *Plant J.* 16:651-659 и Gura, (2000) *Nature* 404:804-808).

В другом варианте описывается применение последовательностей растительных вирусов для управления супрессией проксимальных последовательностей, кодирующих мРНК (публикация согласно РСТ WO 1998/36083).

В недавней работе было описано применение "шпильковых" структур, которые включают всю мРНК-кодирующей последовательности в комплементарной ориентации или ее часть, что приводит к потенциальной структуре "стебель-петля" у экспрессированной РНК (публикация согласно РСТ WO 1999/53050). В данном случае стебель формируется полинуклеотидами, соответствующими гену, представляющему интерес, в смысловой или в антисмысловой ориентации по отношению к промотору, а петля формируется несколькими полинуклеотидами гена, представляющего интерес, которые не имеют комплементарной последовательности в конструкции. Это повышает частоту косупрессии или сайленсинга в регенерированных трансгенных растениях. Обзор шпильковой супрессии см. в Wesley, et al., (2003) *Methods in Molecular Biology, Plant Functional Genomics: Methods and Protocols* 236:273-286.

Конструкция, в которой стебель образован по меньшей мере 30 нуклеотидами из гена, который подлежит супрессии, и петля образована случайной нуклеотидной последовательностью, также эффективно применялась для супрессии (публикация согласно РСТ WO 1999/61632).

Также было описано применение последовательностей поли-Т и поли-А для получения стебля в структуре "стебель-петля" (публикация согласно РСТ WO 2002/00894).

Еще один вариант включает применение синтетических повторов для содействия образованию стебля в структуре "стебель-петля". Было показано, что трансгенные организмы, полученные с такими фрагментами рекомбинантной ДНК, характеризуются сниженными уровнями белка, кодируемого нуклеотидным фрагментом, который образует петлю, как описано в публикации согласно РСТ WO 2002/00904.

РНК-интерференция относится к процессу, специфичному в отношении последовательности посттранскрипционного сайленсинга генов у животных, который опосредован короткими интерферирующими РНК (siRNA) (Fire, et al., (1998) *Nature* 391:806).

Соответствующий процесс у растений обычно называют посттранскрипционным сайленсингом генов (PTGS) или РНК-опосредованным сайленсингом, и также называют подавлением у грибов. Процесс посттранскрипционного сайленсинга генов считается эволюционно-консервативным механизмом клеточной защиты, применяющимся для предотвращения экспрессии чужеродных генов, и он широко распространен у различных представителей растительного мира и типов животных (Fire, et al., (1999) *Trends Genet.* 15:358). Такая защита от экспрессии чужеродных генов могла развиваться в ответ на выработку двухнитевых РНК (dsRNA), полученных в результате вирусной инфекции или в результате случайной интеграции транспозонных элементов в геном хозяина, путем клеточного ответа, который специфически разрушает гомологичную РНК вирусной геномной РНК. Присутствие dsRNA в клетках вызывает RNAi-ответ через механизм, который полностью еще не охарактеризован.

Присутствие длинных dsRNA в клетках стимулирует активность фермента рибонуклеазы III, назы-

ваемого "дайсер". Дайсер вовлекается в процессинг dsRNA с образованием коротких фрагментов dsRNA, называемых короткими интерферирующими РНК (siRNA) (Berstein et al., Nature 409:363, 2001). Как правило, короткие интерферирующие РНК, полученные в результате активности дайсер, имеют длину от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов, и включают дуплексы из приблизительно 19 пар оснований (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Кроме того, дайсер был вовлечен в вырезание 21- и 22-нуклеотидных небольших временных РНК (stRNA) из РНК-предшественника консервативной структуры, которые вовлечены в контроль на уровне трансляции (Hutvagner, et al., (2001) Science 293:834). Для RNAi-ответа также характерен эндонуклеазный комплекс, обычно называемый комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), который опосредует расщепление однонитевой РНК, последовательность которой комплементарна антисмысловой нити дуплекса siRNA. Расщепление целевой РНК происходит в середине участка, комплементарного антисмысловой нити дуплекса siRNA (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Кроме того, РНК-интерференция также может подразумевать сайленсинг генов, опосредованный небольшими РНК (например, miRNA), предположительно посредством клеточных механизмов, которые регулируют структуру хроматина, и тем самым предотвращают транскрипцию последовательностей целевых генов (см., например, Allshire, (2002) Science 297:1818-1819; Volpe, et al., (2002) Science 297:1833-1837; Jenuwein, (2002) Science 297:2215-2218 и Hall, et al., (2002) Science 297:2232-2237). Таким образом, молекулы miRNA по настоящему изобретению можно применять для опосредования сайленсинга генов путем взаимодействия с РНК-транскриптами или в качестве альтернативы взаимодействия с конкретными генными последовательностями, где такое взаимодействие приводит к сайленсингу генов либо на транскрипционном, либо на посттранскрипционном уровне.

Дополнительно предусмотрены способы и композиции, которые обеспечивают возможность повышения уровня RNAi, получаемой с помощью элемента сайленсинга. В таких вариантах осуществления в способах и композициях используется первый полинуклеотид, содержащий элемент сайленсинга для целевой последовательности вредителя, функционально связанный с промотором, активным в растительной клетке; и второй полинуклеотид, содержащий усиливающий супрессию элемент, содержащий целевую последовательность вредителя или ее активный вариант или фрагмент, функционально связанные с промотором, активным в растительной клетке. Объединенная экспрессия элемента сайленсинга с усиливающим супрессию элементом ведет к увеличению амплификации ингибиторных РНК, вырабатываемых на основе элемента сайленсинга сверх того уровня, который достигается при экспрессии только элемента сайленсинга самого по себе. В дополнение к увеличенной амплификации специфических видов молекул для RNAi самих по себе, способы и композиции дополнительно обеспечивают возможность выработки отличающейся группы видов молекул для RNAi, которые могут улучшать эффективность нарушения экспрессии целевого гена. Таким образом, когда усиливающий супрессию элемент экспрессируется в растительной клетке в комбинации с элементом сайленсинга, способы и композиции могут обеспечивать возможность системной выработки молекул для RNAi по всему растению; выработку больших количеств молекул для RNAi, чем можно было бы наблюдать в случае только конструкции элемента сайленсинга отдельно; и улучшенную загрузку молекул для RNAi во флоэму растения, таким образом обеспечивается лучший контроль насекомых, питающихся флоэмой, с помощью подхода с RNAi. Таким образом, различные способы и композиции обеспечивают улучшенные способы доставки ингибиторных РНК целевому организму. См., например, публикацию заявки на патент США 2009/0188008.

Используемый в данном документе термин "усиливающий супрессию элемент" предусматривает полинуклеотид, содержащий целевую последовательность, подлежащую супрессии, или ее активный фрагмент или вариант. Понятно, что усиливающий супрессию элемент не должен быть идентичным целевой последовательности, но усиливающий супрессию элемент скорее может содержать вариант целевой последовательности, при условии, что последовательность усиливающего супрессию элемента в достаточной степени идентична целевой последовательности, чтобы обеспечить возможность повышенного уровня RNAi, получаемой с помощью элемента сайленсинга, сверх того уровня, который достигается при экспрессии только элемента сайленсинга. Аналогично, усиливающий супрессию элемент может содержать фрагмент целевой последовательности, где фрагмент имеет достаточную длину, чтобы обеспечить возможность повышенного уровня RNAi, получаемой с помощью элемента сайленсинга, сверх того уровня, который достигается при экспрессии только элемента сайленсинга.

Понятно, что можно использовать несколько усиливающих супрессию элементов из одной целевой последовательности, или из различных целевых последовательностей, или из различных участков одной целевой последовательности. Например, используемые усиливающие супрессию элементы могут содержать фрагменты целевой последовательности, полученные из другого участка целевой последовательности (т.е. из 3'UTR, кодирующей последовательности, интрона и/или 5'UTR). Кроме того, усиливающий супрессию элемент может содержаться в каскаде экспрессии, как описано в другом месте данного документа, и в определенных вариантах осуществления усиливающий супрессию элемент находится на одном или на другом ДНК-векторе или конструкции по отношению к элементу сайленсинга. Усиливающий супрессию элемент может быть функционально связан с промотором, раскрытым в данном документе. Признается тот факт, что усиливающий супрессию элемент может экспрессироваться конститутивно, или в качестве альтернативы он может вырабатываться способом, зависящим от стадии, с использовани-

ем различных индуцируемых, или предпочтительных для ткани, или регулируемых в ходе развития промоторов, которые обсуждаются в другом месте данного документа.

В определенных вариантах осуществления при использовании как элемента сайленсинга, так и усиливающего супрессию элемента системная выработка молекул для RNAi происходит по всему растению. В дополнительных вариантах осуществления растение или части растения по настоящему изобретению имеют повышенную нагрузку молекул для RNAi во флоэме растения, что можно было наблюдать при экспрессии конструкции элемента сайленсинга отдельно, и таким образом обеспечивается лучший контроль насекомых, питающихся флоэмой, с помощью подхода с использованием RNAi. В определенных вариантах осуществления растения, части растения и растительные клетки по настоящему изобретению можно дополнительно охарактеризовать как обеспечивающие возможность выработки разнообразных видов молекул для RNAi, которые могут улучшать эффективность нарушения экспрессии целевого гена.

В определенных вариантах осуществления объединенная экспрессия элемента сайленсинга и усиливающего супрессию элемента повышает концентрацию ингибиторных РНК в растительной клетке, растении, части растения, растительной ткани или флоэме сверх того уровня, который достигается при экспрессии элемента сайленсинга отдельно.

Используемый в данном документе термин "повышенный уровень ингибиторных РНК" предусматривает какое-либо статистически значимое повышение уровня молекул для RNAi, вырабатываемых в растении, обладающем комбинированной экспрессией по сравнению с соответствующим контрольным растением. Например, повышение уровня RNAi в растении, части растения или растительной клетке может предусматривать по меньшей мере приблизительно 1%, приблизительно 1-5%, приблизительно 5-10%, приблизительно 10-20%, приблизительно 20-30%, приблизительно 30-40%, приблизительно 40-50%, приблизительно 50-60%, приблизительно 60-70%, приблизительно 70-80%, приблизительно 80-90%, приблизительно 90-100% или большее повышение уровня RNAi в растении, части растения, растительной клетке или флоэме по сравнению с соответствующим контролем. В других вариантах осуществления повышение уровня RNAi в растении, части растения, растительной клетке или флоэме может предусматривать по меньшей мере приблизительно 1-кратное, приблизительно 1-5-кратное, приблизительно 5-10-кратное, приблизительно 10-20-кратное, приблизительно 20-30-кратное, приблизительно 30-40-кратное, приблизительно 40-50-кратное, приблизительно 50-60-кратное, приблизительно 60-70-кратное, приблизительно 70-80-кратное, приблизительно 80-90-кратное, приблизительно 90-100-кратное или большее повышение уровня RNAi в растении, части растения, растительной клетке или флоэме по сравнению с подходящим контролем. Примеры объединенной экспрессии элемента сайленсинга с усиливающим супрессию элементом для контроля щитников и *Lygus* можно найти в публикации заявки на патент США 2011/0301223 и публикации заявки на патент США 2009/0192117.

Некоторые варианты осуществления относятся к понижающей регуляции экспрессии целевых генов у видов насекомых-вредителей с помощью интерферирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК). В публикации согласно РСТ WO 2007/074405 описаны способы подавления экспрессии целевых генов у беспозвоночных вредителей, в том числе колорадского жука. В публикации согласно РСТ WO 2005/110068 описаны способы подавления экспрессии целевых генов у беспозвоночных вредителей, в том числе, в частности, у западного кукурузного жука, в качестве средства контроля заражения насекомыми. Кроме того, в публикации согласно РСТ WO 2009/091864 описаны композиции и способы супрессии целевых генов из видов насекомых-вредителей, в том числе вредителей из рода *Lygus*. Молекулы нуклеиновой кислоты, в том числе молекулы для RNAi для нацеливания на Н-субъединицу вакуолярной АТФазы, пригодны для контроля популяции и заражения жесткокрылыми вредителями, как описано в публикации заявки на патент США 2012/0198586. В публикации согласно РСТ WO 2012/055982 описана рибонуклеиновая кислота (РНК или двухнитевая РНК), которая подавляет или обеспечивает понижающую регуляцию целевого гена, который кодирует: рибосомальный белок насекомого, такой как рибосомальный белок L19, рибосомальный белок L40 или рибосомальный белок S27A; субъединицу протеасомы насекомого, такую как белок Rpn6, Pros 25, белок Rpn2, белок бета 1 субъединицы протеасомы или белок бета 2 Pros; β -коатомер COPI-везикулы насекомого, γ -коатомер COPI-везикулы, β' -коатомерный белок или ζ -коатомер COPI-везикулы; белок тетраспанин 2 А насекомого, который представляет собой предполагаемый белок трансмембранного домена; белок насекомого, принадлежащий к семейству актина, такой как актин 5С; белок убиквитин-5Е насекомого; белок Sec23 насекомого, который представляет собой активатор ГТФазы, вовлеченной во внутриклеточный транспорт белков; белок "crinkled" насекомого, который представляет собой нестандартный миозин, который вовлечен в двигательную активность; белок "crooked neck" насекомого, который вовлечен в регуляцию ядерного альтернативного сплайсинга мРНК; белок G-субъединицы вакуолярной Н⁺-АТФазы насекомого и Tbp-1 насекомого, такой как Tat-связывающий белок. В публикации согласно РСТ WO 2007/035650 описана рибонуклеиновая кислота (РНК или двухнитевая РНК) которая подавляет или понижающе регулирует экспрессию целевого гена, кодирующего Snf7. В публикации заявки на патент США 20150176009 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на Rnapii-140, который обеспечивают устойчивость к жесткокрылым вредителям. В публикации заявки на патент США 2011/0054007 описаны

полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RPS10. В публикациях заявки на патент США 2014/0275208 и US2015/0257389 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RyanR и PAT3. В публикациях заявок на патенты США 2012/029750, US 20120297501 и 2012/0322660 описаны интерферирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК или двухнитевая РНК), которые функционируют при поглощении видами насекомых-вредителей с понижающей регуляцией экспрессии целевого гена в указанном насекомом-вредителе, где РНК содержит по меньшей мере один элемент сайленсинга, где элемент сайленсинга представляет собой участок двухнитевой РНК, содержащий гибридные комплементарные нити, из которых одна нить содержит или состоит из последовательности нуклеотидов, которая, по меньшей мере, частично, комплементарна целевой нуклеотидной последовательности в пределах целевого гена. В публикации заявки на патент США 2012/0164205 описаны потенциальные мишени для интерферирующих двухнитевых рибонуклеиновых кислот для подавления беспозвоночных вредителей, в том числе: гомологичная последовательность Chd3, гомологичная последовательность бета-тубулина, гомологичная последовательность весом 40 кДа V-АТФазы, гомологичная последовательность EF1 α , гомологичная последовательность субъединицы р28 протеосомы 26S, гомологичная последовательность эпоксидгидролазы ювенильного гормона, гомологичная последовательность белка хлоридных каналов, зависящих от набухания, гомологичная последовательность белка глюкоза-6-фосфат-1-дегидрогеназы, гомологичная последовательность белка Act42A, гомологичная последовательность фактора 1 АДФ-рибозилирования, гомологичная последовательность белка фактора транскрипции ПВ, гомологичные последовательности хитиназы, гомологичная последовательность фермента, конъюгирующего убиквитин, гомологичная последовательность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гомологичная последовательность убиквитина В, гомолог эстеразы ювенильного гормона и гомологичная последовательность альфа-тубулина.

Применение в пестицидном контроле.

Из уровня техники известны общие способы использования штаммов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления или ее вариант, в пестицидном контроле или в конструировании других организмов в качестве пестицидных средств.

Могут быть выбраны микроорганизмы-хозяева, которые как известно заселяют "фитосферу" (филлоплан, филлосферу, ризосферу и/или ризоплан) одной или нескольких сельскохозяйственных культур, представляющих интерес. Эти микроорганизмы выбирают таким образом, чтобы они могли успешно конкурировать в конкретной окружающей среде с микроорганизмами дикого типа, обеспечивать стабильное поддержание и экспрессию гена, экспрессирующего полипептид IPD090, и желателно обеспечивать улучшенную защиту пестицида от разрушения и инактивации в окружающей среде.

В качестве альтернативы полипептид IPD090 получали путем введения гетерологичного гена в клетку-хозяина. Экспрессия гетерологичного гена приводит, непосредственно или опосредованно, к выработке и сохранению пестицида внутри клетки. Эти клетки затем обрабатывают в условиях, которые продлевают активность токсина, продуцируемого в клетке, когда осуществляют применение клетки в отношении среды, окружающей целевого(целевых) вредителя(вредителей). Полученный продукт сохраняет токсичность токсина. Эти естественным образом инкапсулированные полипептиды IPD090 можно затем составлять в соответствии с традиционными методиками для внесения в среду, окружающую целевого вредителя, например в почву, воду и на листву растений. См., например, EPA 0192319 и ссылаемые документы, приведенные в нем.

Пестицидные композиции.

В некоторых вариантах осуществления активные ингредиенты можно наносить в форме композиции, и можно наносить на возделываемую площадь или растение, подлежащие обработке, одновременно или последовательно с другими соединениями. Эти соединения могут представлять собой удобрения, средства борьбы с сорняками, криопротекторы, поверхностно-активные вещества, детергенты, пестицидные мыла, масла, применяемые во время состояния покоя, полимеры и/или составы с носителем с замедленным высвобождением или биоразлагаемым носителем, который обеспечивает длительное дозированное внесение в целевой области после однократного нанесения состава. Они также могут представлять собой селективные гербициды, химические инсектициды, вируциды, микробициды, амeboциды, пестициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскоциды или смеси из нескольких этих препаратов, при необходимости вместе с дополнительными приемлемыми с точки зрения сельского хозяйства носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными веществами, способствующими нанесению, традиционно используемыми в области техники, связанной с получением составов. Подходящие носители и вспомогательные вещества могут быть твердыми или жидкими и соответствуют веществам, обычно используемым в технологии составления, например природным или регенерированным минеральным веществам, растворителям, диспергирующим веществам, смачивающим веществам, веществам, придающим клейкость, связующим или удобрениям. Аналогично, составы можно готовить в виде съедобных "приманок" или формировать в "ловушки" для вредителей, что обеспечивает поедание или заглывание пестицидного состава целевым вредителем.

Способы нанесения активного ингредиента или агрохимической композиции, которая содержит по меньшей мере один из полипептидов IPD090, продуцируемых штаммами бактерий, включают нанесение

на листья, покрытие семян и внесение в почву. Количество применений и норма применения зависят от интенсивности поражения соответствующим вредителем.

Композицию можно составлять в виде порошка, дуста, пеллеты, гранулы, распыляемого раствора, эмульсии, коллоидного вещества, раствора и т.п., и ее можно получать с помощью таких традиционных способов как сушка, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, осаждение или концентрирование культуры клеток, содержащих полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат по меньшей мере один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 99% по весу.

Вредителей групп чешуекрылых, двукрылых, настоящих клопов, нематод, полужесткокрылых или жесткокрылых можно уничтожать или уменьшать их количество в указанной области с помощью способов по настоящему раскрытию или средства можно наносить профилактически на область в окружающей среде с целью предотвращения заражения восприимчивым вредителем.

Предпочтительно, вредитель заглатывает пестицидно эффективное количество полипептида или контактирует с ним. Термин "пестицидно эффективное количество", используемый в данном документе, относится к количеству пестицида, которое может приводить к гибели по меньшей мере одного вредителя или к заметно сниженному росту, питанию или нормальному физиологическому развитию вредителя. Данное количество будет варьировать в зависимости от таких факторов, как, например, специфические целевые вредители, подлежащие контролю, специфическая среда, местоположение, растение, культура или сельскохозяйственный участок, подлежащий обработке, условия окружающей среды и способ, норма, концентрация, стабильность и количество применений пестицидно эффективной полипептидной композиции. Составы также могут варьировать в зависимости от климатических условий, экологических соображений, и/или частоты нанесения, и/или тяжести заражения вредителями.

Описанные пестицидные композиции можно получать путем составления либо суспензии бактериальных клеток, кристаллов и/или спор, либо выделенного белкового компонента с требуемым носителем, приемлемым с точки зрения сельского хозяйства. Композиции можно составлять перед введением с помощью надлежащих способов, таких как лиофилизация, сублимационная сушка, высушивание, или в водном носителе, среде или подходящем растворителе, таком как солевой раствор или другой буфер. Составленные композиции могут находиться в форме дуста, или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или водных эмульсий или эмульсий масло/вода, или в виде смачиваемого порошка, или в комбинации с любым другим материалом носителя, подходящим для сельскохозяйственного применения. Подходящие носители, приемлемые с точки зрения сельского хозяйства, могут быть твердыми или жидкими и хорошо известны из уровня техники. Термин "приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель" охватывает все вспомогательные вещества, инертные компоненты, диспергирующие вещества, поверхностно-активные вещества, вещества, придающие клейкость, связующие и т.д., которые обычно применяют в технологии составления пестицидов; причем они хорошо известны специалистам по составлению пестицидов. Составы можно смешивать с одним или несколькими твердыми или жидкими вспомогательными веществами и получать с помощью различных способов, например, путем равномерного перемешивания, смешивания и/или размалывания пестицидной композиции с подходящими вспомогательными веществами с применением традиционных методик составления. Подходящие составы и способы нанесения описаны в патенте США № 6468523, включенном в данный документ посредством ссылки. Растения можно также обрабатывать одной или несколькими химическими композициями, в том числе одним или несколькими гербицидами, инсектицидами или фунгицидами. Иллюстративные химические композиции включают следующее. Гербициды для фруктов/овощей: атразин, бромацил, диурон, глифосат, линурон, метрибузин, симазин, трифлуралин, флуазифоп, глүфосинат, галосульфурон от Gowan, паракват, пропизамид, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, индазифлам; инсектициды для фруктов/овощей: алдикарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, диазинон, малатион, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, эсфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквиноцил, бифеназат, метоксифенозид, новалурон, кромафенозид, тиаклоприд, динотефуран, флуакрипирим, толфенпирад, клотианидин, спироциклофен, гамма-цигалотрин, спиромезифен, спиносид, ринаксипир, циазипир, спинотерам, трифлумурон, спиро-тетрамат, имидаклоприд, флүбендиамид, тиодикарб, метафлумизон, сульфоксафлор, цифлүметофен, циано-пирafen, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, спиноторам, тиодикарб, флониамид, метиокарб, эмаектин-бензоат, индоксакарб, фортиазат, фенамифос, кадусафос, пирипроксифен, фенбутатин-оксид, гекстиазокс, метомил, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил] (2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он]; фунгициды для фруктов/овощей: карбендазим, хлорталонил, EBDC, сера, тиофанатметил, азоксистробин, цимоксанил, флуазинам, фосетил, ипродион, крезоксим-метил, металаксил/мефеноксам, трифлуксистробин, этабоксам, ипроваликарб, трифлуксистробин, фенгексамид, окспоконазола фумарат, циазофамид, фенамидон, зоксамид, Zogvec™, пикоксистробин, пиракlostробин, цифлүфенамид, боскалид; гербициды для злаков: изопротурон, бромоксинил, иоксинил, фенокси-соединения, хлорсульфурон, клодинафоп, диклофоп, дифлүфеникан, феноксапроп, флорасулам, флүроксипир, метсульфурон, триасульфурон, флүкарбазон, йодосульфурон, пропоксикарбазон, пиколинафен, мезосульфурон, бифлүбутамид, пиноксаден, амидосульфурон, тифенсульфурон-метил, трибенурон, флүпирсульфурон, сульфосульфурон, пирасуль-

фотол, пироксулам, флуфенацет, тралкоксидим, пироксасульфен; фунгициды для злаков: карбендазим, хлороталонил, азоксистробин, ципроконазол, ципродинил, фенпропиморф, эпоксиконазол, крезоксимметил, квиноксифен, тебуконазол, трифлуксистробин, симеконазол, пикоксистробин, пиракlostробин, димоксистробин, протиокконазол, флуоксастробин; инсектициды для злаков: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β -цифлутрин, бифентрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, хлорпирифос, метамидофос, оксидеметон-метил, пиримикарб, метиокарб; гербициды для маиса: атразин, алахлор, бромоксинил, ацетохлор, дикамба, клопиралид, (S-)диметенамид, глюфосинат, глифосат, изоксафлутол, (S-)метолахлор, мезотрион, никосульфурон, примисульфурон, Revulin Q®; римсульфурон, сулькотрион, форамсульфурон, топрамезон, темботрион, сафлуфенацил, тиенкарбазон, флуфенацет, пироксасульфен; инсектициды для маиса: карбофуран, хлорпирифос, бифентрин, фипронил, имидаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тиаметоксам, клотианидин, спиромезифен, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, дельтаметрин, тиодикарб, β -цифлутрин, циперметрин, бифентрин, люфенурон, трифлуморон, тефлутрин, тебупиримфос, этипрол, циазипир, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, авермектин, метиокарб, спиродиклофен, спиротетрамат; фунгициды для маиса: фенитропан, тирам, протиокконазол, тебуконазол, трифлуксистробин; гербициды для риса: бутахлор, пропанил, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даимурон, фентразамид, имазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, пиразосульфурон, пирибутикарб, квинклолак, тиобенкарб, инданофан, флуфенацет, фентразамид, галосульфурон, оксазикломефон, бензобиклион, пирифталид, пеноксулам, биспирибак, оксадиаргил, этоксисульфурон, претилахлор, мезотрион, тефурилтрион, оксадиазон, феноксапроп, примисульфен; инсектициды для риса: диазинон, фенитротрион, фенобукарб, монокротофос, бенфуракарб, бупрофезин, динетофуран, фипронил, имидаклоприд, изопрокарб, тиаклоприд, кромафенозид, тиаклоприд, динетофуран, клотианидин, этипрол, флубендиамид, ринаксипир, дельтаметрин, ацетамиприд, тиаметоксам, циазипир, спиносид, спиноторам, эмаектин-бензоат, циперметрин, хлорпирифос, картап, метамидофос, этофенпрокс, триазофос, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, карбофуран, бенфуракарб; фунгициды для риса: тиофанат-метил, азоксистробин, карпропамид, эдифенфос, феримзон, ипробенфос, изопропиолан, пенцикурон, пробеназол, пироквилон, трициклазол, трифлуксистробин, диклоцимет, феноксанил, симеконазол, тиадинил; гербициды для хлопчатника: диурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралин, карфентразон, клетодим, флуазифопбутил, глифосат, норфлуразон, пендиметалин, пиритиобак-натрий, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флумиоксазин, тидиазурон; инсектициды для хлопчатника: ацефат, алдикарб, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, малатион, монокротофос, абамектин, ацетамиприд, эмаектин бензоат, имидаклоприд, индосакарб, лямбда-цигалотрин, спиносид, тиодикарб, гамма-цигалотрин, спиромезифен, пиридалил, флоникамид, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, бета-цифлутрин, спиротетрамат, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, динетофуран, флубендиамид, циазипир, спиносид, спиноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тиодикарб, авермектин, флоникамид, пиридалил, спиромезифен, сульфоксафлор, профенофос, триазофос, эндосульфен; фунгициды для хлопчатника: этридиязол, металаксил, квинтозен; гербициды для сои: алахлор, бентазон, трифлуралин, хлоримурон-этил, хлорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, глифосат, имазамокс, имазаквин, имазетапир, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалин, тепралоксидим, глюфосинат; инсектициды для сои: лямбда-цигалотрин, метомил, паратион, тиокарб, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, спиносид, спиноторам, эмаектин-бензоат, фипронил, этипрол, дельтаметрин, β -цифлутрин, гамма- и лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, спиротетрамат, спинодиклофен, трифлумурон, флоникамид, тиодикарб, бета-цифлутрин; фунгициды для сои: азоксистробин, ципроконазол, эпоксиконазол, флутриафол, пиракlostробин, тебуконазол, трифлуксистробин, протиокконазол, тетраконазол; гербициды для сахарной свеклы: хлоридазон, десмедифам, этофумезат, фенмедифам, триаллат, клопиралид, флуазифоп, ленацил, метамитрон, квинмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, квизалофоп; инсектициды для сахарной свеклы: имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, дельтаметрин, β -цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксипир, циаксипир, фипронил, карбофуран; гербициды для канолы: клопиралид, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, глифосат, метазахлор, трифлуралин, этаметсульфурон, квинмерак, квизалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгициды для канолы: азоксистробин, карбендазим, флудиоксонил, ипродион, прохлораз, винклозолин; инсектициды для канолы: карбофурановые фосфоорганические соединения, пиретроиды, тиаклоприд, дельтаметрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, ацетамиприд, динетофуран, β -цифлутрин, гамма и лямбда-цигалотрин, тау-флувалерият, этипрол, спиносид, спиноторам, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он.

В некоторых вариантах осуществления гербицид представляет собой атразин, бромацил, диурон, хлорсульфурон, метсульфурон, тифенсульфурон-метил, трибенурон, ацетохлор, дикамбу, изоксафлутол, никосульфурон, римсульфурон, пиритиобак-натрий, флумиоксазин, хлоримурон-этил, метрибузин, квизалофоп, S-метолахлор, гексазинон или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления инсектицид представляет собой эсфенвалерат, хлорантранилипрол, метомил, индоксакарб, оксамил или их комбинацию.

Пестицидная и инсектицидная активность.

"Вредитель" включает без ограничения насекомых, грибки, бактерии, нематод, клещей, иксодовых клещей и т. п. Насекомые-вредители включают насекомых, выбранных из отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera и т.д., в частности Lepidoptera и Coleoptera.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что не все соединения в равной степени эффективны в отношении всех вредителей. Соединения согласно вариантам осуществления проявляют активность в отношении насекомых-вредителей, которые могут включать экономически важных вредителей агрономических, лесных, тепличных продуктов, продуктов питомников декоративных растений, продуктов пищи и волокнистых продуктов, продуктов, связанных со здоровьем людей и животных, продуктов, связанных с домашней и коммерческой структурой, товаров для дома и продуктов для хранения.

Личинки из отряда Lepidoptera включают без ограничения совок, подгрызающих совок, пядениц и гелиотин семейства Noctuidae Spodoptera frugiperda JE Smith (совка травяная); *S. exigua* Hübner (совка малая); *S. litura* Fabricius (табачная совка, гусеница, пожирающая соцветия); *Mamestra configurata* Walker (совка Берта); *M. brassicae* Linnaeus (совка капустная); *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка-ипсилон); *A. orthogonia* Morrison (совка прямоугольная); *A. subterranea* Fabricius (совка зернистая); *Alabama argillacea* Hübner (совка хлопковая американская); *Trichoplusia ni* Hübner (совка ни); *Pseudoplusia includens* Walker (соевая совка); *Anticarsia gemmatilis* Hübner (совка бархатных бобов); *Hypena scabra* Fabricius (совка клеверная); *Heliothis virescens* Fabricius (табачная листовертка); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (совка луговая); *Athetis mindara* Barnes и McDunnough (совка шершавая); *Euxoa messoria* Harris (чернобокая гусеница совки); *Earias insulana* Boisduval (совка хлопковая египетская); *E. vittella* Fabricius (совка пятнистая); *Helicoverpa armigera* Hübner (совка щетинконогая резедовая); *H. zea* Boddie (совка кукурузная или хлопковая совка); *Melanchra picta* Harris (гусеница совки); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (цитрусовая совка); огневка, чехлоноска, бабочек, строящих паутинные гнезда, конусных бабочек и вредителей, скелетирующих листья, из семейства Pyralidae *Ostrinia nubilalis* Hübner (мотылек стеблевой кукурузный); *Amyelois transitella* Walker (гусеницы, повреждающие рубчики цитрусовых); *Anagasta kuehniella* Zeller (огневка мельничная); *Cadra cautella* Walker (огневка сухофруктовая); *Chilo suppressalis* Walker (желтая рисовая огневка); *C. partellus*, (сорговая огневка); *Corcyra cephalonica* Stainton (огневка рисовая); *Crambus caliginosellus* Clemens (огневка кукурузная); *C. teterrellus* Zincken (огневка мятликовая); *Snaphalocrocis medinalis* Guenée (листовертка рисовая); *Desmia funeralis* Hübner (виноградная листовертка); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (дынная огневка); *D. nitidalis* Stoll (огневка огурцов-пикули); *Diatraea grandiosella* Dyar (огневка кукурузная юго-западная); *D. saccharalis* Fabricius (огневка сахарного тростника); *Eoreuma loftini* Dyar (мексиканская рисовая огневка); *Ephestia elutella* Hübner (огневка зерновая (какао)); *Galleria mellonella* Linnaeus (большая восковая моль); *Herpetogramma licarsialis* Walker (огневка-травянка); *Homoeosoma electellum* Hulst (огневка подсолнечниковая); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (малая кукурузная огневка); *Achroia grisella* Fabricius (малая восковая моль); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (луговой мотылек); *Orthaga thyrisalis* Walker (чайная моль); *Maruca testulalis* Geyer (огневка акациевая); *Plodia interpunctella* Hübner (моль индийская мучная); *Scirpophaga incertulas* Walker (стеблевая рисовая огневка); *Udea rubigalis* Guenée (огневка ржаво-коричневая); а также листовертка, листовертка-почкоедов, плодоядор и гусениц-вредителей плодов из семейства Tortricidae *Acleris gloverana* Walsingham (западная черноголовая листовертка); *A. variana* Fernald (восточная черноголовая листовертка); *Archips argyospila* Walker (листовертка плодовых деревьев); *A. rosana* Linnaeus (европейская листовертка) и другие виды *Archips*, *Adoxophyes orana* Fischer von Roslerstamm (листовертка сетчатая); *Cochylis hospes* Walsingham (полосатая подсолнечниковая моль); *Cydia latiferreana* Walsingham (лещинная плодоядорка); *C. pomonella* Linnaeus (яблонная плодоядорка); *Platynota flavedana* Clemens (листовертка изменчивая); *P. stultana* Walsingham (листовертка всеядная); *Lobesia botrana* Denis & Schiffmüller (листовертка европейская виноградная); *Spilonota ocellana* Denis & Schiffmüller (листовертка почковая); *Endopiza viteana* Clemens (листовертка виноградная); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (листовертка гроздевая); *Bonagota salubricola* Meurick (листовертка бразильская яблочная); *Grapholita molesta* Busck (плодоядорка восточная персиковая); *Suleima helianthana* Riley (листовертка подсолнечниковая); *Argyrotaenia* spp.; *Choristoneura* spp.

Другие выбранные сельскохозяйственные вредители из отряда Lepidoptera включают без ограничения *Alsophila pometaria* Harris (осенний плодовой червь); *Anarsia lineatella* Zeller (моль фруктовая полосатая); *Anisota senatoria* J.E. Smith (сатурния оранжевая дубовая); *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville (китайский дубовый шелкопряд); *Bombyx mori* Linnaeus (тутовый шелкопряд); *Bucculatrix thurberiella* Busck (кривоусая хлопковая моль); *Colias eurytheme* Boisduval (люцерновая желтушка); *Datana integerrima* Grote & Robinson (хохлатка ореховая); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (сибирский шелкопряд); *Ennomos subsignaria* Hübner (пяденица ильмовая); *Erannis tiliaria* Harris (пяденица липовая); *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (шелкопряд золотистый); *Harrisina americana* Guerin-Meneville (пироморфида американская); *Hemileuca oliviae* Cockrell (гусеница бабочки-сатурнии); *Hypantria cunea* Drury (американская белая бабочка); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (томатная моль); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (пяденица

гемлоковая восточная); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (пяденица гемлоковая западная); *Leucoma salicis* Linnaeus (волнянка ивовая); *Lymantria dispar* Linnaeus (непарный шелкопряд); *Manduca quinquemaculata* Haworth (бражник пятиточечный, томатный бражник); *M. sexta* Haworth (томатный бражник, табачный бражник); *Operophtera brumata* Linnaeus (пяденица зимняя); *Palaearctia vernata* Peck (пяденица весенняя); *Papilio cresphontes* Cramer (парусник кресфонтеc, "апельсиновая собака"); *Phryganidia californica* Packard (коконопряд кольчатый калифорнийский); *Phyllocnistis citrella* Stainton (цитрусовая мушка-минер); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (моль-пестрянка плодовая нижнесторонняя); *Pieris brassicae* Linnaeus (белянка капустная большая); *P. rapae* Linnaeus (белянка капустная малая); *P. napi* Linnaeus (белянка брюквенная); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пальцекрылка артишоковая); *Plutella xylostella* Linnaeus (моль капустная); *Pectinophora gossypiella* Saunders (розовый коробочный червь); *Pontia protodice* Boisduval and Leconte (клетчатая белянка); *Sabulodes aegrotata* Guenée (всеядная пяденица); *Schizura concinna* J.E. Smith (хохлатка); *Sitotroga cerealella* Olivier (моль ячменная ангумуазская); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller (походный шелкопряд сосновый); *Tineola bisselliella* Hummel (моль комнатная); *Tuta absoluta* Meyrick (томатная моль); *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаевая моль плодовая); *Heliothis subflexa* Guenée; *Malacosoma* spp. и *Orgyia* spp.

Представляют интерес личинки и имаго из отряда Coleoptera, в том числе долгоносики из семейств Anthribidae, Bruchidae и Curculionidae (в том числе без ограничения *Anthonomus grandis* Boheman (долгоносик хлопковый); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (долгоносик рисовый водяной); *Sitophilus granarius* Linnaeus (долгоносик амбарный); *S. oryzae* Linnaeus (долгоносик рисовый); *Hypera punctata* Fabricius (долгоносик точечный); *Cylindrocopturus adspersus* LeConte (долгоносик подсолнечниковый стеблевой); *Smicronyx fulvus* LeConte (красный подсолнечниковый долгоносик); *S. sordidus* LeConte (серый подсолнечниковый долгоносик); *Sphenophorus maidis* Chittenden (долгоносик маисовый)); земляные блошки, огуречные листоеды, корневые черви, листоеды, картофельные жуки и листовые минеры семейства Chrysomelidae (в том числе без ограничения *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадский жук); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (западный кукурузный жук); *D. barberi* Smith and Lawrence (северный кукурузный жук); *D. undecimpunctata howardi* Barber (южный кукурузный жук); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (земляная кукурузная блошка); *Phyllotreta crueferae* Goeze (блошка крестоцветная); *Phyllotreta striolata* (полосатая блошка); *Colaspis brunnea* Fabricius (листоед виноградный); *Oulema melanopus* Linnaeus (пьявица красногрудая); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (подсолнечниковый листоед)); жуки из семейства Coccinellidae (в том числе без ограничения *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканская фасолевая коровка)); хрущи и другие жуки из семейства Scarabaeidae (в том числе без ограничения: *Popillia japonica* Newman (хрущик японский); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляк северный, хрущ); *C. immaculata* Olivier (дупляк южный, хрущ); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (хрущ европейский); *Phyllophaga crinita* Burmeister (личинка хруща); *Ligyris gibbosus* De Geer (жук морковный)); кожееды семейства Dermestidae; проволочники из семейства Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp., *Conoderus* spp., *Limonium* spp., *Agriotes* spp., *Stenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короеды из семейства Scolytidae и жуки из семейства Tenebrionidae.

Представляют интерес имаго и незрелые особи отряда Diptera, в том числе минирующие мушки *Agromyza parvicornis* Loew (кукурузная минирующая мушка); галлицы (в том числе без ограничения *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлица сортовая); *Mayetiola destructor* Say (гессенская муха); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (злаковая оранжевая галлица); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt, (подсолнечниковая галлица)); плодовые мушки (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (плодовые мушки); цветочные мухи (в том числе без ограничения: *Delia platura* Meigen (муха ростковая); *D. coarctata* Fallen (муха озимая) и другие *Delia* spp., *Meromyza americana* Fitch (американская меромиза); *Musca domestica* Linnaeus (комнатные мухи); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (малые комнатные мухи); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалки осенние)); мухи полевые, жигалки, мухи мясные, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp. и другие мухи-вредители надсемейства Muscoidea, слепни *Tabanus* spp.; носоглоточные оводы *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; бычьи оводы *Hypoderma* spp.; пестряки *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (кровососки овечьи) и другие *Brachycera*, комары *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; мошки *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; мокрецы, москиты, сциариды и другие Nematocera.

В качестве представляющих интерес насекомых включены имаго и насекомые на стадии нимфы отрядов Hemiptera и Homoptera, такие как без ограничения хермесы из семейства Adelgidae, слепняки из семейства Miridae, цикады из семейства Cicadidae, цикадки, *Empoasca* spp.; из семейства Cicadellidae, насекомые надсемейства Fulgoroidea из семейств Cixiidae, Flatidae, Fulgoroidea, Issidae и Delphacidae, горбатки из семейства Membracidae, листоблошки из семейства Psyllidae, белокрылки из семейства Aleyrodidae, тли из семейства Aphididae, филлоксеры из семейства Phylloxeridae, мучнистые червецы из семейства Pseudococcidae, червецы из семейств Asterolecanidae, Coccidae, Dactylopiidae, Diaspididae, Eriococcidae, Orthozoidae, Phoenicococcidae и Margarodidae, кружевницы из семейства Tingidae, щитники из семейства Pentatomidae, клопы-черепашки, *Blissus* spp.; и другие наземники из семейства Lygaeidae, пенницы из семейства Coreoridae, краевики из семейства Coreidae, а также красноклопы и красноклопы хлопковые из семейства Pygmaeoridae.

Важные с точки зрения сельского хозяйства представители отряда Homoptera дополнительно включают без ограничения: *Acyrtosiphon pisum* Harris (тля гороховая); *Aphis craccivora* Koch (тля

люцерновая); *A. fabae* Scopolii (тля свекловичная); *A. gossypii* Glover (тля хлопковая, тля бахчевая); *A. maidiradicis* Forbes (тля кукурузная корневая); *A. pomi* De Geer (тля яблоневая); *A. spiraeicola* Patch (тля зеленая цитрусовая); *Aulacorthum solani* Kaltentbach (тля картофельная обыкновенная); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (тля земляничная американская); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (русская пшеничная тля); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (тля яблоневая розовая); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (тля яблоневая кровяная); *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (капустная тля); *Hyalopterus pruni* Geoffroy (тля сливовая опыленная); *Lipaphis erysimi* Kaltentbach (тля ложноклапуста); *Metopolophium dirrhodum* Walker (розанно-злаковая тля); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (большая картофельная тля); *Muzus persicae* Sulzer (тля персиковая, тля оранжерейная); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (тля салатная зеленая); *Pemphigus* spp. (тли корневые и тли галловые); *Rhopalosiphum maidis* Fitch (тля сортовая); *R. padi* Linnaeus (тля черемуховая обыкновенная); *Schizaphis graminum* Rondani (тля злаковая обыкновенная); *Sipha flava* Forbes (тля желтая сахарного тростника); *Sitobion avenae* Fabricius (тля листовая); *Therioaphis maculata* Buckton (пятнистая люцерновая тля); *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (тля померанцевая) и *T. citricida* Kirkaldy (тля цитрусовая); *Adelges* spp. (хермесы); *Phylloxera devastatrix* Pergande (филлоксеры гикори); *Bemisia tabaci* Gennadius (белокрылка табачная, белокрылка хлопковая); *B. argentifolii* Bellows и Perring (белокрылка магнолиевая); *Dialeurodes citri* Ashmead (белокрылка цитрусовая); *Trialeurodes abutiloneae* (белокрылка полосатокрылая) и *T. vaporariorum* Westwood (белокрылка тепличная); *Empoasca fabae* Hargis (цикадка картофельная); *Laodelphax striatellus* Fallen (темная цикадка); *Macrolestes quadrilineatus* Forbes (цикадка астровая); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадка зеленая); *N. nigropictus* Stal (рисовая цикадка); *Nilaparvata lugens* Stål (бурая рисовая цикадка); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикадка кукурузная); *Sogatella furcifera* Horvath (цикадка белоспинная); *Sogatodes orizicola* Muir (дельфацид рисовый); *Typhlocyba pomaria* McAtee (цикадка яблоневая); *Egythronoura* spp. (цикадки виноградные); *Magicicada septendecim* Linnaeus (периодическая цикада); *Icerya purchasi* Maskell (червец австралийский желобчатый); *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (щитовка калифорнийская); *Planococcus citri* Risso (мучнистый червец виноградный); *Pseudococcus* spp. (другие мучнистые червцы); *Cacopsylla pyricola* Foerster (листоблошка грушевая); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблошка хурмовая).

Виды, представляющие интерес с точки зрения сельского хозяйства, из отряда Hemiptera включают без ограничения: *Acrosternum hilare* Say (щитник зеленый); *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик печальный); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп-черепашка); *Corythuca gossypii* Fabricius (кружевница хлопковая); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатный); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (красноклоп хлопковый); *Euschistus servus* Say (клоп коричневый вонючий); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (щитник однопятнистый); *Graptostethus* spp. (комплекс клопов-наземников); *Leptoglossus corculus* Say (клоп-краевик сосновый); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп луговой); *L. hesperus* Knight (слепняк западный матовый); *L. pratensis* Linnaeus (клопик полевой); *L. rugulipennis* Poppius (клоп травяной европейский); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зеленый слепняк); *Nezara viridula* Linnaeus (зеленый овощной клоп); *Oebalus pugnax* Fabricius (клоп-щитник рисовый); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (клоп молочайный большой); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (клоп-слепняк хлопковый).

Кроме того, варианты осуществления могут быть эффективными в отношении Hemiptera, таких как *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблоневый северный); *Cyrtopeltis modestus* Distant (томатный клоп); *Cyrtopeltis notatus* Distant (клоп-слепняк); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (слепняк белоточечный); *Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп-слепняк гледичии); *Labopidicola allii* Knight (слепняк луковый); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп быстрый); *Poecilopsus lineatus* Fabricius (слепняк четырехлинейный); *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (ложная черепашка); *Nezara viridula* Linnaeus (зеленый овощной клоп); *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blotomatidae* spp.; *Reduviidae* spp. и *Cimicidae* spp.

Также включены имаго и личинки из отряда Acari (клещи), такие как *Aceria tosichella* Keifer (галловый клещ пшеничный); *Petrobia latens* Müller (петробия многоядная); клещики паутинные и клещики красные семейства Tetranychidae, *Panonychus ulmi* Koch (красный плодовый клещ); *Tetranychus urticae* Koch (обыкновенный паутинный клещ); *T. mcdanieli* McGregor (клещик Макданиела); *T. cinnabarinus* Boisduval (красный паутинный клещик); *T. turkestanicus* Ugarov & Nikolski (туркестанский паутинный клещик); плоские клещи семейства Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisi* McGregor (оранжевый клещ); ржавчинные и почковые клещи семейства Eriophyidae и другие клещи, питающиеся листьями, а также клещи, важные для здоровья человека и животных, т. е. пылевые клещи семейства Epidermoptidae, железницы семейства Demodicidae, зерновые клещи семейства Glucyphagidae, иксодовые клещи отряда Ixodidae. *Ixodes scapularis* Say (черноногий клещ); *I. holocyclus* Neumann (австралийский паралитический клещ); *Dermacentor variabilis* Say (клещ иксодовый собачий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (иксодовый клещ *Amblyomma*) и конские и чесоточные клещи семейств Psoroptidae, Pyemotidae и Sarcoptidae.

Представляющими интерес насекомыми-вредителями из отряда Thysanura являются, например, *Leprisma saccharina* Linnaeus (чешуйница); *Thermobia domestica* Packard (термобия).

Дополнительные охватываемые вредители-артроподы включают: пауков из отряда Araneae, таких как *Loxosceles reclusa* Gertsch and Mulaik (бурый паук-отшельник) и *Latrodectus mactans* Fabricius (черная

вдова), а также многоножек из отряда Scutigeraomorpha, таких как *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (обыкновенная мухоловка).

Насекомое-вредитель, представляющее интерес, включает надсемейство щитников и других родственных насекомых, в том числе без исключения виды, принадлежащие к семейству Pentatomidae (*Nezara viridula*, *Halyomorpha halys*, *Piezodorus guildini*, *Euschistus servus*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus heros*, *Euschistus tristigmus*, *Acrosternum hilare*, *Dichelops furcatus*, *Dichelops melacanthus*, и *Bagrada hilaris* (клоп из рода *Bagrada*)), семейству Plataspidae (*Megacopta cribraria* полушаровидный щитник) и семейству Cydnidae (*Scaptocoris castanea* - коричневый клоп-землекоп), а также виды Lepidoptera, в том числе без ограничения: моль капустную, например *Helicoverpa zea* Boddie; соевую совку, например *Pseudoplusia includens* Walker, и совку бархатных бобов, например *Anticarsia gemmatalis* Hübner.

Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в уровне техники. См., например, Czaplá and Lang, (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews, et al., (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Как правило, белок смешивают и применяют в анализах питания. См., например, Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать приведение растений в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения выживать и/или вызывать гибель вредителей.

Нематоды включают паразитических нематод, таких как галловые, цистообразующие и ранящие нематоды, в том числе *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. и *Globodera* spp.; в частности представителей цистообразующих нематод, в том числе без ограничения *Heterodera glycines* (соевая цистообразующая нематода); *Heterodera schachtii* (цистообразующая нематода свеклы); *Heterodera avenae* (цистообразующая нематода злаков), а также *Globodera rostochiensis* и *Globodera pailida* (цистообразующие нематоды картофеля). Ранящие нематоды включают *Pratylenchus* spp.

Средство для обработки семян.

Для защиты и для повышения урожайности и улучшения технологий усовершенствования признаков дополнительные средства для обработки семян могут обеспечивать дополнительную приспособляемость культурных растений и экономически эффективный контроль в отношении насекомых, сорняков и заболеваний. Семенной материал можно обрабатывать, обычно обрабатывать поверхность с помощью композиции, содержащей комбинации химических или биологических гербицидов, антидотов гербицидов, инсектицидов, фунгицидов, ингибиторов и усилителей прорастания, питательных веществ, регуляторов и активаторов роста растений, бактерицидов, нематоцидов, авицидов и/или моллюскоцидов. Эти соединения обычно составляют вместе с дополнительными носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными веществами, способствующими нанесению, традиционно используемыми в области, связанной с получением составов. Покрытия можно наносить с помощью пропитки материала для размножения жидким составом или с помощью покрытия комбинированным влажным или сухим составом. Примеры различных типов соединений, которые можно применять в качестве средств для обработки семян, представлены в *The Pesticide Manual: A World Compendium*, C.D.S. Tomlin Ed., опубликованном British Crop Production Council, который тем самым включен в данный документ посредством ссылки.

Некоторые средства для обработки семян, которые можно применять в отношении семян культур, включают без ограничения один или несколько из абсцизовой кислоты, ацибензолар-S-метила, авермектина, амитрола, азаконазола, азоспириллума, азадирахтина, азоксистробина, *Bacillus* spp. (в том числе один или несколько из видов *cereus*, *firmus*, *megaterium*, *pumilis*, *sphaericus*, *subtilis* и/или *thuringiensis*), *bradyrhizobium* spp. (в том числе один или несколько из *betae*, *canariense*, *elkanii*, *iriomotense*, *japonicum*, *liaonigense*, *rachyrhizi* и/или *yuanmingense*), каптана, карбоксина, хитозана, клотианидина, меди, циазипира, дифеноконазола, этидиазола, фипронила, флудиоксонила, флуокастробина, флуквинконазола, флуразола, флукофенима, белка гарпина, имазазила, имидаклоприда, ипконазола, изофлавоноидов, липохитоолигосахарида, манкозеба, марганца, манеба, мефеноксама, металаксила, метконазола, миклбутанила, PCNB, пенфлуфена, пинециллума, пентиопирада, перметрина, пикоксистробина, протиоконазола, пираклостробина, ринакиспира, S-метолахлора, сапонины, седаксана, TCMТВ, тебуконазола, тиабендазола, тиаметоксама, тиакарба, тирама, толклофос-метила, триадименола, триходермы, трифлуксистробина, тритриконазола и/или цинка. Покрытие семян PCNB, относящееся к номеру регистрации EPA 00293500419, содержит квинтозен и терразол. TCMТВ обозначает 2-(тиоцианометилтио)бензотиазол.

Сорта семян и семена со специфическими трансгенными признаками можно тестировать для определения того, какие дополнительные варианты обработки семян и нормы внесения могут дополнять такие сорта и трансгенные признаки для повышения урожайности. Например, сорт с хорошей потенциальной урожайностью, но восприимчивостью к пыльной головне, может выиграть от применения средства для обработки семян, которое обеспечивает защиту от пыльной головни, сорт с хорошей потенциальной урожайностью, но восприимчивостью к цистообразующим нематодам, может выиграть от применения средства обработки семян, которое обеспечивает защиту от цистообразующей нематоды и т.д. Аналогично, сорт, включающий трансгенный признак, который обеспечивает устойчивость к насекомым, может выиграть от второго механизма действия, придаваемого средством для обработки семян, сорт, вклю-

чающий трансгенный признак, который придает устойчивость к гербициду, может выиграть от средства обработки семян с антидотом, который повышает устойчивость растений к такому гербициду и т.д. Кроме того, хорошее укоренение и ранняя всхожесть, которые являются результатом правильного применения средства для обработки семян, могут приводить к более эффективному использованию азота, лучшей способности переносить засуху и общему повышению потенциальной урожайности сорта или сортов, содержащих определенный признак, в комбинации со средством для обработки семян.

Способы уничтожения насекомого-вредителя и контроля популяции насекомых.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы уничтожения насекомого-вредителя, включающие приведение насекомого-вредителя, либо одновременно, либо последовательно, в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида IPD090 или химерного полипептида IPD090 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы уничтожения насекомого-вредителя, включающие приведение насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного пестицидного белка с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы контроля популяции насекомого-вредителя, включающие приведение популяции насекомого-вредителя, либо одновременно, либо последовательно, в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида IPD090 или химерного полипептида IPD090 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы контроля популяции насекомого-вредителя, включающие приведение популяции насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его варианта. Термины "осуществление контроля популяции вредителя" или "контроль вредителя", используемые в данном документе, относятся к любому эффекту в отношении вредителя, который приводит к ограничению вреда, причиняемого вредителем. Контроль вредителя включает без ограничений уничтожение вредителя, подавление развития вредителя, изменение плодовитости или роста вредителя таким образом, что вредитель оказывает меньше вреда в отношении растения, снижение количества производимого потомства, получение менее приспособленных вредителей, получение вредителей, более восприимчивых к нападению хищников или удержание вредителей от поедания растения.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы контроля популяции насекомого-вредителя, устойчивого к пестицидному белку, предусматривающие приведение популяции насекомого-вредителя, либо одновременно, либо последовательно, в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида IPD090 или химерного полипептида IPD090 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы контроля популяции насекомого-вредителя, устойчивого к пестицидному белку, предусматривающие приведение популяции насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы защиты растения от насекомого-вредителя, включающие обеспечение экспрессии в растении или его клетке по меньшей мере одного рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего полипептид IPD090 или химерный полипептид IPD090. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы защиты растения от насекомого-вредителя, включающие обеспечение экспрессии в растении или его клетке рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы защиты растения от насекомого-вредителя, включающие обеспечение экспрессии в растении или его клетке рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего полипептид с SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387, SEQ ID NO: 388 или его варианты. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы защиты растения от насекомого-вредителя, включающий обеспечение экспрессии в растении или его клетке рекомбинантного полинуклеотида с SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382 или SEQ ID NO: 383.

Стратегии управления устойчивостью насекомых (IRM).

Было доказано, что экспрессия δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* в трансгенных растениях кукурузы является эффективным средством контроля важных с точки зрения сельского хозяйства насекомых-вредителей (Perlak, et al., 1990; 1993). Однако, возникли насекомые, которые устойчивы к δ -эндотоксинам *B. thuringiensis*, экспрессирующимся в трансгенных растениях. Такая устойчивость, если она станет широко распространенной, будет явно ограничивать коммерческое значение идиоплазмы, содержащей гены, кодирующие такие δ -эндотоксины *B. thuringiensis*.

Одним способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении целевых вредителей и одновременного снижения развития устойчивых к инсектицидам вредителей является применение полученных нетрансгенных (т.е. с неинсектицидным белком) рефугиев (раздел неинсектицидных сельскохозяйственных культур/кукурузы) для применения трансгенных сельскохозяйственных культур,

вырабатывающих один инсектицидный белок, активный в отношении целевых вредителей. Управление по охране окружающей среды Соединенных Штатов Америки (epa.gov/oppbpdll/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm, доступ к которому можно получить с применением приставки www) публикует требования по применению трансгенных сельскохозяйственных культур, вырабатывающих один Bt-белок, активный в отношении целевых вредителей. Кроме того, Национальная ассоциация кукурузоводов на своем веб-сайте: (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn, доступ к которому можно получить с применением приставки www) также предлагает аналогичные руководства, касающиеся требований к рефугиям. Из-за потерь, обусловленных насекомыми в пределах зоны рефугиев, более крупные рефугии могут снижать общую урожайность.

Другим способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении целевых вредителей и одновременного снижения развития устойчивых к инсектицидам вредителей будет хранение инсектицидных генов, которые эффективны в отношении групп насекомых-вредителей и которые проявляют свои эффекты посредством отличающихся механизмов действия.

Экспрессия в растении двух или больше инсектицидных композиций, токсичных для одного вида насекомых, при этом каждый инсектицид экспрессируется на эффективных уровнях, будет представлять собой другой способ для достижения контроля развития устойчивости. Это основано на принципе, что эволюция устойчивости к двум отдельным механизмам действия значительно менее вероятна, чем только к одному. Например, Roush описывает стратегию двух токсинов, также называемую "создание пирамиды" или "пакетирование", для управления инсектицидными трансгенными сельскохозяйственными культурами. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353:1777-1786). Пакетирование или создание пирамиды из двух различных белков, каждый из которых эффективен в отношении целевых вредителей, и при этом отсутствует перекрестная устойчивость или она невелика, может обеспечивать возможность применения меньшего рефугия. Управление по охране окружающей среды США требует существенно меньший (как правило 5%) структурированный рефугий для высаживания кукурузы, не являющейся Bt, чем для продуктов с одним признаком (как правило 20%). Существуют различные способы обеспечения эффектов IRM рефугия, в том числе различные геометрические паттерны высаживания в полях и смеси семян "в мешке", как дополнительно обсуждается у Roush.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды IPD090 по настоящему изобретению являются пригодными в качестве стратегии управления устойчивостью насекомых в комбинации (т.е. в составе пирамиды) с другими пестицидными белками, в том числе без ограничения с Bt-токсинами, инсектицидными белками *Xenorhabdus* sp. или *Photorhabdus* sp., другими инсектицидно активными белками и т.п.

Предусмотрены способы контроля заражения(заражений) насекомыми из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera трансгенного растения, которые обеспечивают управление устойчивостью насекомых, предусматривающие обеспечение экспрессии в растении по меньшей мере двух различных инсектицидных белков, характеризующихся отличающимися механизмами действия.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения насекомыми из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera трансгенного растения и содействия в управлении устойчивостью насекомых предусматривают предоставление по меньшей мере одного из инсектицидных полипептидов-белков IPD090 насекомым из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения насекомыми из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera трансгенного растения и содействия в управлении устойчивостью насекомых предусматривают предоставление по меньшей мере одного из полипептидов IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или их вариантов, инсектицидных в отношении насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения насекомыми из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera трансгенного растения и содействия в управлении устойчивостью насекомых предусматривают обеспечение экспрессии в трансгенном растении полипептида IPD090 и белка Cту или другого белка, инсектицидного в отношении насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, при этом они характеризуются отличающимися механизмами действия.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения насекомыми из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera трансгенного растения и содействия в управлении устойчивостью насекомых предусматривают обеспечение экспрессии в трансгенном растении полипептида IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его вариантов и белка Cту или другого белка, инсектицидного в отношении насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, при этом полипептид IPD090 и белок Cту характеризуются отличающимися механизмами действия.

Также предусмотрены способы снижения вероятности появления устойчивости у насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera к трансгенным растениям, экспрессирующим в растениях инсектицидные белки для контроля видов насекомых, предусматривающие обеспечение экспрессии полипептида IPD090, инсектицидного в отношении вида насекомых, в комбинации со вторым белком, инсектицидным в отношении вида насекомых, при этом они характеризуются отличающимися механизмами действия.

Также предусмотрены средства для эффективного управления устойчивостью насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera к трансгенным растениям, предусматривающие обеспечение совместной

экспрессии на высоких уровнях в растениях двух или больше инсектицидных белков, токсичных для насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, но при этом каждый проявляет отличающийся механизм осуществления его активности применительно к уничтожению, где два или больше инсектицидных белка предусматривают полипептид IPD090 и белок Cry. Также предусматриваются средства для эффективного управления устойчивостью насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera к трансгенным растениям, предусматривающие обеспечение совместной экспрессии на высоких уровнях в растениях двух или больше инсектицидных белков, токсичных для насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, но при этом каждый проявляет отличающийся механизм осуществления его активности применительно к уничтожению, где два или больше инсектицидных белка представляют собой полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или его вариант и белок Cry или другой инсектицидно активный белок.

Кроме того, предусмотрены способы получения разрешения контролирующих органов для выращивания или коммерческой реализации растений, экспрессирующих белки, инсектицидные в отношении насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, включающие стадию обращения, предоставления или ссылки на данные анализов связывания белков насекомых, демонстрирующие, что полипептид IPD090 не конкурирует с сайтами связывания для белков Cry у таких насекомых. Кроме того, предусмотрены способы получения разрешения контролирующих органов для выращивания или коммерческой реализации растений, экспрессирующих белки, инсектицидные в отношении насекомых из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera, предусматривающие стадию обращения, предоставления или ссылки на данные анализов связывания белков насекомых, показывающих, что полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 384 или их варианты не конкурируют с сайтами связывания для белков Cry у таких насекомых.

Способы увеличения урожайности растения.

Предусмотрены способы увеличения урожайности. Способы предусматривают получение растения или растительной клетки, экспрессирующих полинуклеотид, кодирующий пестицидную полипептидную последовательность, раскрытую в данном документе, и выращивание растения или его семени в поле, зараженном вредителем, в отношении которого полипептид характеризуется пестицидной активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется пестицидной активностью в отношении вредителя из группы чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, полужесткокрылых или нематод, и при этом поле заражено вредителем из группы чешуекрылых, полужесткокрылых, жесткокрылых, двукрылых или нематод.

Как определено в данном документе, "урожайностью" растения называют качество и/или количество биомассы, продуцируемой растением. Термин "биомасса", используемый в данном документе, относится к любому измеренному продукту растения. Увеличением продукции биомассы является любое улучшение урожайности измеренного продукта растения. Увеличение урожайности растения имеет несколько коммерческих применений. Например, увеличение биомассы листьев растения может приводить к увеличению урожайности листовых овощей для потребления человеком или животными. Кроме того, увеличение биомассы листьев можно применять для увеличения производства фармацевтических или промышленных продуктов растительного происхождения. Увеличение урожайности может предусматривать любое статистически значимое увеличение, в том числе без ограничения по меньшей мере 1% повышение, по меньшей мере 3% повышение, по меньшей мере 5% повышение, по меньшей мере 10% повышение, по меньшей мере 20% повышение, по меньшей мере 30% повышение, по меньшей мере 50% повышение, по меньшей мере 70% повышение, по меньшей мере 100% или большее повышение урожайности по сравнению с растением, не экспрессирующим пестицидную последовательность.

В конкретных способах урожайность растения повышается в результате улучшенной устойчивости к вредителю растения, экспрессирующего полипептид IPD090, раскрытый в данном документе. Экспрессия полипептида IPD090 приводит к сниженной способности вредителя к заражению растения или питанию на растении, улучшая таким образом урожайность растения.

Способы переработки.

Дополнительно предусмотрены способы переработки растения, части растения или семени с получением пищевого или кормового продукта из растения, части растения или семени, содержащих полинуклеотид IPD090. Растения, части растения или семена, предусматриваемые в данном документе, можно перерабатывать с получением масла, белковых продуктов и/или побочных продуктов, которые являются производными, полученными путем переработки, которые имеют коммерческое значение. Неограничивающие примеры включают трансгенные семена, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IPD090, который можно перерабатывать с получением соевого масла, соевых продуктов и/или побочных продуктов сои.

"Переработка" относится к любым физическим и химическим способам, применяемым для получения какого-либо соевого продукта, и включает без ограничения кондиционирование нагреванием, вальцевание и измельчение, экстразию, экстракцию растворителем или вымачивание в воде и экстракцию цельных или дробленых семян.

Следующие примеры представлены для иллюстрации, а не для ограничения.

Экспериментальная часть.

Пример 1. Идентификация инсектицидного белка, активного в отношении западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte - WCRW) из штамма JH34071-1.

Инсектицидный белок, обозначенный как IPD090Aa, идентифицировали с помощью очистки белка, секвенирования N-концевых аминокислот и ПЦР-клонирования из штамма JH34071-1 *Pseudomonas* sp. следующим образом. Инсектицидную активность в отношении WCRW наблюдали с клеточным лизатом JH34071-1, который выращивали в триптическом соевом бульоне (TSB, пептон из казеина 15 г/л; пептон из соевых продуктов 5,0 г/л; NaCl 5,0 г/л) и культивировали в течение 1 дня при 28°C со встряхиванием при 200 об./мин. Данная инсектицидная активность характеризовалась чувствительностью к нагреванию и протеазе, что указывало на белковую природу.

Биологические анализы с WCRW проводили с применением образцов клеточного лизата, смешанных с рационом для *Diabrotica* (Frontier Agricultural Sciences, Ньюарк, Делавэр), в 96-луночном формате. Новорожденных WCRW помещали в каждую лунку 96-луночного планшета. Анализ проводили в течение четырех дней при 25°C и затем проводили оценку смертности насекомых и остановки роста насекомых. Показателями отмечали погибших (3), со значительным отставанием в росте (2) (небольшой рост или отсутствие роста, но живые), с остановкой роста (1) (рост до второй личиночной стадии, но не эквивалентные контролям) или отсутствие активности (0). Образцы, демонстрирующие смертность или тяжелую остановку изучали дополнительно.

Геномную ДНК выделенного штамма JH34071-1 получали в соответствии с протоколом конструирования библиотеки, разработанным Illumina, и секвенировали с применением Illumina® Genome Analyzer Ix (Illumina Inc., 9885 Towne Center Drive, Сан-Диего, Калифорния, 92121). Собирали последовательности контигов нуклеиновых кислот и получали открытые рамки считывания. Проводили поиск в отношении 16S рибосомной ДНК-последовательности штамма JH34071-1 с помощью BLAST™ относительно базы данных NCBI, идентифицируя штамм JH34071-1 как относящийся к виду рода *Pseudomonas*.

Клеточный осадок штамма JH34071-1 гомогенизировали при ~30000 psi после повторного суспендирования в 20 mM Tris-буфере, pH 8, с "полной, без EDTA" смесью ингибиторов протеаз (Roche, Индианаполис, Индиана). Неочищенный лизат осветляли с помощью центрифугирования и доводили до 75% насыщения с помощью сульфата аммония. Раствор 75% сульфата аммония затем центрифугировали и отбрасывали надосадочную жидкость. Часть осадка суспендировали в 20 mM Tris, pH 8,0, и затем доводили до 1,5 M сульфата аммония с помощью добавления 2 M сульфата аммония, 20 mM раствора Tris, pH 8,0. Данный раствор осветляли и загружали в колонку TSKgel™ Phenyl-5PW (Tosoh Bioscience, Токио, Япония), уравновешенную в 20 mM Tris, pH 8,0, 1,5 M сульфате аммония. Инсектицидную активность элюировали с помощью градиента к 20 mM Tris, pH 8. Активные фракции объединяли, концентрировали на центрифужных концентраторах с ограничением молекулярной массы 10 кДа (Sartorius Stedim, Геттинген, Германия) и обессоливали в 20 mM пиперазине, pH 9,5, с применением колонки Sephadex G25 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси). Обессоленный пул загружали в колонку Mono Q™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенную в 20 mM пиперазине, pH 9,5, и элюировали с помощью градиента 0-0,4 M NaCl. Активные фракции объединяли и загружали в колонку Superdex™ 200 (GE Healthcare), уравновешивали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В анализе SDS-PAGE фракций отмечали, что активность в отношении WCRW совпадала в выраженной полоской после окрашивания с помощью реагента GelCode™, окрашивающего в синий цвет (Thermo Fisher Scientific®). Полоску с белком вырезали, расщепляли трипсином и анализировали с помощью нано-жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (нано-LC/ESI-MS/MS) на масс-спектрометре Thermo Q Exactive™ Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific®, 81 Wyman Street, Уолтем, Массачусетс, 02454), сопряженном с системой Eksigent™ NanoLC™ 1-D Plus nano-lc (AB Sciex™, 500 Old Connecticut Path, Фрамингэм, Массачусетс, 01701). Идентификацию белка осуществляли с помощью поиска во внутренней базе данных с применением Mascot® (Matrix Science, 10 Pettins Lane, Лондон, NW3 1QY, Великобритания), посредством чего идентифицирован полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), кодируемый полинуклеотидом с SEQ ID NO: 1. С помощью клонирования и рекомбинантной экспрессии подтверждали инсектицидную активность полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в отношении WCRW.

Пример 2. Идентификация гомологов IPD090Aa.

Генную идентичность можно определить посредством проведения поисков BLAST™ (средство поиска основного локального выравнивания 20; Altschul, et al. (1993) *J. Molec. Biol.* 215: 403-410; см. также ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, доступ к которому можно получить с применением приставки www) со стандартными параметрами относительно сходства с последовательностями, которые содержатся в общедоступной базе данных BLAST (содержащей все неизбыточные CDS трансляции из GenBank, последовательности, полученные на основании 3-мерной структуры баз данных Brookhaven и DDBJ). Кроме общедоступных баз данных проводили поиск по базам данных DuPont Pioneer. IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) показал отдаленную гомологию с белками, которые имеют № ID по Pfam PF01823, что характеризуются доменами мембраноатакующего комплекса/перфорина (MACPF) (ссылка на базу данных Pfam: en.wikipedia.org/wiki/Pfam, доступ к которой можно получить с применением приставки www). Несколь-

ко идентифицированных гомологов полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), характеризующихся различной процентной идентичностью, показаны в табл. 1. В табл. 2 показана матричная таблица попарных взаимоотношений идентичности для глобальных выравниваний гомологов IPD090 на основании алгоритма ClustalW, реализованного с применением модуля ALIGNX® пакета программ Vector NTI® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми стандартными параметрами.

Таблица 1

Идентификационный номер белка	Идентичность с IPD090Aa	Идентификационный номер штамма	Вид	Полинуклеотид	Полипептид
IPD090Aa		JH34071-1, SSP342A9-1	<i>Pseudomonas sp.</i>	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
IPD090Ab	99,8%	SS342A7-1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
IPD090Ca	79,3%	JH23589-1, JH23611-2, JH23959-1, JH59556-2, JH61488-2, JH62159-2, JH62167-1, JH62246-2, JH62258-1, JH62270-2, и JH62417-2	<i>Pseudomonas entomophila</i>	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
IPD090Fa	49,4%	Номер доступа в GenBank № WP_019961352	<i>Woodsholea maritima</i>	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
IPD090Ac	89,1%	SSP1049E7-	<i>Pseudomonas monteilii</i>	SEQ ID NO: 380	SEQ ID NO: 384
IPD090Ga	38,9	Номер доступа в GenBank № WP_012039071	<i>Clavibacter michiganensis</i>	SEQ ID NO: 381	SEQ ID NO: 385
IPD090Gb	35,6	Номер доступа в GenBank № WP_012145116	<i>Serratia proteamaculans</i>	SEQ ID NO: 382	SEQ ID NO: 386
IPD090Gc	37,9	Номер доступа в GenBank № WP_046018755.1	<i>Marinomonas sp.</i>	SEQ ID NO: 383	SEQ ID NO: 387
IPD090Gd	36,2	Номер доступа в GenBank № WP_073439185	<i>Serratia plymuthica</i>		SEQ ID NO: 388

Таблица 2

	IPD090Ab SEQ ID NO: 4	IPD090Ac SEQ ID NO:	IPD090Ca SEQ ID NO: 6	IPD090Cd SEQ ID NO: 379	IPD090Fa SEQ ID NO: 8	IPD090Ga SEQ ID NO: 385	IPD090Gb SEQ ID NO: 386	IPD090Gc SEQ ID NO: 387	IPD090Gd SEQ ID NO: 388
IPD090Aa SEQ ID NO: 2	99,8	89,1	79,3	79,8	50,8	38,9	35,6	37,9	36,2
IPD090Ab SEQ ID NO: 4	-	88,9	79,1	79,5	50,8	38,7	35,4	37,7	36,0
IPD090Ac SEQ ID NO: 384	-	-	76,8	77,6	48,9	36,8	35,1	36,6	35,4
IPD090Ca SEQ ID NO: 6	-	-	-	80,3	48,5	36,2	35,5	36,9	36,9
IPD090Cd SEQ ID NO: 379	-	-	-	-	47,2	37,7	36,3	37,7	38,7
IPD090Fa SEQ ID NO: 8	-	-	-	-	-	34,5	34,3	39,4	35,3
IPD090Ga SEQ ID NO: 385	-	-	-	-	-	-	34,3	32,7	33,5
IPD090Gb SEQ ID NO: 386	-	-	-	-	-	-	-	33,5	82,8
IPD090Gc SEQ ID NO: 387	-	-	-	-	-	-	-	-	32,9

С помощью секвенирования генома пула бактериальных штаммов определили полинуклеотид с SEQ ID NO: 378, кодирующий гомолог IPD090, IPD090Cd (SEQ ID NO: 379), характеризующийся ~80% идентичностью аминокислотной последовательности с IPD090Ca (SEQ ID NO: 6).

Пример 3. Экспрессия IPD090Aa в *E. coli*.

Пептидные фрагменты из анализа MS применяли для расположения кодирующей последовательности IPD090Aa (SEQ ID NO: 1) в контиге JH34071-1. Кроме того, N-концевое секвенирование применяли для подтверждения предсказанного сайта инициации. Кодирующую последовательность использовали для конструирования праймеров CTB54-FOR (SEQ ID NO: 354) и CTB55-REV (SEQ ID NO: 355) для клонирования кодирующей последовательности IPD090Aa (SEQ ID NO: 1) (с нативным стоп-кодоном TAG) в pET-24a (Novagen®) для немеченной трансляции и pET-14b (Novagen®) для N-концевой трансляции метки 6X-His с применением сайтов NdeI/XhoI. Кроме того, кодирующую последовательность использовали для конструирования праймеров CTB54-FOR (SEQ ID NO: 354) и CTB56-REV (SEQ ID NO: 356) для клонирования кодирующей последовательности IPD090Aa (SEQ ID NO: 1) (без стоп-кодона) в pET-24a (Novagen®) для C-концевой трансляции метки 6X-His с применением сайтов NdeI/XhoI. Использовали мастер-микс с горячим стартом KOD (EMD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния) для ПЦР-амплификации гена IPD090Aa в термоциклере Bio-Rad™ C1000 Touch™. Параметры циклов являлись следующими: 1 цикл при 95°C в течение 2 мин; 35 циклов при 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 10 с и 70°C в течение 15 с; 1 цикл при 70°C в течение 2 мин. Ампликоны очищали из геля, лигировали (ДНК-лигаза T4, New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в векторы экспрессии (как описано выше), трансформировали в химически компетентные клетки с высокой эффективностью *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Уолтем, Массачусетс) и клоны подтверждали с помощью секвенирования.

Экспрессирующие конструкции IPD090Aa с N-концевой 6X His (SEQ ID NO: 346) и IPD090Aa с C-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 348) трансформировали в клетки *E. coli* BL21 (DE3, Agilent, Санта-Клара, Калифорния) для экспрессии. Культуры в одном литре бульона Лурия (содержащего соответствующий антибиотик) выращивали до достижения OD₆₀₀, составляющей примерно 0,6, а затем культуры индуцировали с помощью 0,3 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) и обеспечивали рост в течение дополнительных 18 ч при 16°C, 100 об./мин. Культуры центрифугировали при 5000 gcf в течение 15 мин для осаждения клеток. Клеточный осадок лизировали с помощью реагента 1/4 B-PER™ II (Thermo Scientific), 20 мМ Tris pH 8,0, эндонуклеазы OmniCleave™ (Epicentre), лизоцима ReadyLyse™ (Epicentre) и ингибиторов протеаз HALT™ (Life Technologies) в течение 30 мин с раскачиванием при комнатной

температуре. Лизаты осветляли посредством центрифугирования при 13000 gcf в течение 10 мин и супернатанты переносили в 10 мМ имидазол, а затем наносили на отдельные 2,5 мл колонки Ni-NTA (QIAGEN® Inc., Валенсия, Калифорния, 91355), уравновешенные с помощью PBS, 10 мМ имидазола. Колонки промывали с помощью 5 мл 20, 40 и 80 мМ имидазола в PBS. Рекомбинантно экспрессированный полипептид IPD090Aa с N-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 347) и полипептид IPD090Aa с C-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 349) элюировали из колонок с помощью 2,5 мл 150 мМ имидазола в PBS. Оба 2,5 мл элюата наносили на отдельные колонки для обессоливания PD10 (GE Healthcare) и белки элюировали с помощью 3,5 мл PBS. Очищенные и обессоленные полипептид IPD090Aa с N-концевой (SEQ ID NO: 347) и полипептид IPD090Aa с C-концевой меткой 6X-His (SEQ ID NO: 349) подвергали биологическому анализу в отношении WCRW, и они были активны (табл. 3). Кроме того, чистый лизат полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) из 50 мл раствора для индуцирования осветляли с помощью FPLC и подвергали биологическому анализу в отношении WCRW, и он был активен (см. пример 4 ниже).

Пример 4. Очистка рекомбинантного полипептида IPD090Aa.

Клеточный осадок из 1 л культуры *E. coli*, экспрессирующей полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), суспендировали в 100 мл 20 мМ Tris, pH 8,0+1:100 смеси ингибитора протеиназ HALT™ (Life Technologies). Клетки лизировали при 30000 PSI и лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин. К надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М и обессоливали уравновешивание раствора в течение ночи. После осветления загружали надосадочную жидкость в колонку Phenyl-5PW (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенную в 1,5 М сульфате аммония, 20 мМ Tris, pH 8,0. Колонку промывали 4-кратным объемом колонки (CV) и фракции, содержащие полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), элюировали с помощью 10 CV градиента к 20 мМ Tris, pH 8,0. Элюат с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) концентрировали и дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке S200 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенной в PBS. На основании SDS-PAGE объединяли фракции с очищенным полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2).

Пример 5. Анализы очищенного белка IPD090Aa с использованием Coleoptera.

Биологические анализы-скрининги инсектицидной активности проводили с очищенным рекомбинантным полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), а также полипептидом IPD090Aa с N-концевой His-меткой (SEQ ID NO: 347) и полипептидом IPD090Aa с C-концевой His-меткой (SEQ ID NO: 349) для оценки эффектов инсектицидного белка в отношении личинок разновидности Coleoptera, в том числе западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*) - WCRW и северного кукурузного жука (*Diabrotica barberi*) - NCRW, при этом анализы питания Coleoptera проводили на искусственном рационе, содержащем инсектицидный белок. Инсектицидные белки включали в искусственный рацион, специфический для жесткокрылых (Frontier Agricultural Sciences, Ньюарк, Делавэр). Белки анализировали в серии разведений от 188 ppm до 6 ppm. Одну новорожденную личинку помещали в каждую лунку для питания ad libitum в течение 4 дней. Каждый биологический анализ проводили с восьмью повторностями при каждой дозе. Результаты выражали как положительные в отношении реакций личинок, таких как остановка развития и/или смертность. Результаты выражали как отрицательные, если личинки были подобны отрицательному контролю, который питался рационом, в котором использовался только вышеуказанный буфер. Средний показатель WCRW для серии разведений из 8 повторностей анализа для полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), полипептида IPD090Aa с N-концевой 6X His (SEQ ID NO: 347) и полипептида IPD090Aa с C-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 349) показаны в табл. 3.

Таблица 3

Очищенный полипептид	Концентрация полипептида (ppm)	Средн. Показатель WCRW	Очищенный полипептид	Конц. полипептида (ppm)	Средн. Показатель WCRW	Очищенный полипептид	Конц. полипептида (ppm)	Средн. Показатель WCRW
IPD090Aa	188	2,4	IPD090	188	2,5	IPD090	188	2,0
SEQ ID	131	2,0	Aa с	131	2,0	Aa с	131	2,0

NO: 2	94	2,0	N- конц. 6X-His SEQ ID NO: 347	94	2,3	C- конц. 6X-His SEQ ID NO: 349	94	1,8
	66	2,0		66	2,0		66	1,8
	47	2,0		47	2,0		47	1,3
	33	1,8		33	1,8		33	1,4
	23	1,4		23	2,0		23	1,5
	16	1,3		16	1,0		16	1,0
	12	0,3		12	1,1		12	0,4
	8	0		8	0,5		8	0,3
	6	0		6	0,1		6	0,0
Контроль в виде буфера PBS	0	0	Контроль в виде буфера PBS	0	0	Контроль в виде буфера PBS	0	0

Пример 6. Экспрессия *E. coli* и инсектицидная активность полипептида IPD090Aa с N-концевым усечением.

С помощью биологических анализов на WCRW с трипсинизированным полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) отметили, что усеченный продукт IPD090Aa являлся инсектицидным. С помощью N-концевого секвенирования фрагмента трипсинизированного полипептида IPD090Aa показали, что образовался полипептидный продукт, начинающийся с аланина 25 SEQ ID NO: 2. Синтезировали полинуклеотид (SEQ ID NO: 9), кодирующий полипептид IPD090Aa(TR1) (SEQ ID NO: 10), с помощью амплификации гена IPD090Aa (SEQ ID NO: 1) с использованием праймеров CTB142-FOR (SEQ ID NO: 357) и CTB55-REV (SEQ ID NO: 355) для клонирования кодирующей последовательности IPD090Aa (TR1) (с нативным стоп-кодоном TAG) в pET-24a (Novagen) для немеченной трансляции. Использовали мастермикс с горячим стартом KOD (EMD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния) для ПЦР-амплификации гена IPD090Aa (TR1) в термоциклере Bio-Rad® C1000 Touch™. Параметры циклов являлись следующими: 1 цикл при 95°C в течение 2 мин; 35 циклов при 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 10 с и 70°C в течение 15 с; 1 цикл при 70°C в течение 2 мин. Ампликоны очищали из геля, лигировали (ДНК-лигаза T4, New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в векторы экспрессии (как описано выше), трансформировали в химически компетентные клетки с высокой эффективностью *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen) и клоны подтверждали с помощью секвенирования.

Подтвержденные клоны, экспрессирующие полипептид IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10), трансформировали в клетки BL21-Gold для экспрессии для 1 л индуцированных. Индукционные осадки лизировали в 30 мл буфера для лизиса (20 mM Tris pH 8, 1/4X B-PER™ II, Omni-Cleave™, Ready-Lyse™ и HALT™ (Life Technologies)) с раскачиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин. К надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М и обеспечивали уравнивание раствора в течение ночи. После осветления загружали надосадочную жидкость в колонку Phenyl-5PW (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравниваемую в 1,5 М сульфате аммония, 20 mM Tris, pH 8,0. Колонку промывали 4-кратным объемом колонки (CV) и фракции, содержащие полипептид IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10), элюировали 10-кратным объемом колонки градиента к 20 mM Tris, pH 8,0. Фракции элюата, содержащие полипептид IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10), концентрировали и обессоливали в буфере PBS с применением колонки Sephadex™ G-25 (GE Healthcare) и подвергали биологическому анализу в отношении WCRW. Средние показатели WCRW для серий разведений из 8 повторностей анализа для полипептида IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10) показаны в табл. 4.

Таблица 4

Очищенный полипептид	Концентрация полипептида (мг/мл)	Средн. Показатель WCRW
IPD090Aa (TR1) SEQ ID NO: 10	2,667	2,8
	1,43	2,3
	0,655	2,0
	0,298	1,5
	0,14	0,4
	0,069	0
	0,035	0

	0,024	0
Контроль в виде буфера PBS	0	0

Пример 7. Экспрессия полипептида IPD090Ca в *E. coli*.

Последовательность, кодирующую полипептид IPD090Ca (SEQ ID NO: 6), выделяли из штамма JH23959-1 с использованием праймеров СТВ60-FOR (SEQ ID NO: 358) и СТВ63-REV (SEQ ID NO: 359) для амплификации гена из штамма JH23959-1 и клонирования кодирующей последовательности IPD090Ca (SEQ ID NO: 5) (с нативным стоп-кодоном (TAA)) в pET-24a (Novagen) для трансляции и pET-14b (Novagen) для N-концевой трансляции метки 6X-His с применением сайтов NdeI/BamHI. Использовали мастер-микс с горячим стартом KOD (EMD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния) для ПЦР-амплификации гена IPD090Ca в термоциклере Bio-Rad™ C1000 Touch™. Параметры циклов являлись следующими: 1 цикл при 95°C в течение 2 мин; 35 циклов при 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 10 с и 70°C в течение 15 с; 1 цикл при 70°C в течение 2 мин. Ампликоны очищали из геля, лигировали (ДНК-лигаза T4, New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в векторы экспрессии (как описано выше), трансформировали в химически компетентные клетки с высокой эффективностью *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen) и клоны подтверждали с помощью секвенирования.

Подтвержденные клоны, экспрессирующие IPD090Ca (SEQ ID NO: 5) в pET-24a /BL21, 50 мл LB-CARB и культуры KAN высевали с 500 мкл культуры, культивированной в течение ночи, и инкубировали при 37°C, 200 об./мин до достижения OD₆₀₀ ~0,8. Культуры индуцировали с помощью 0,3 мМ IPTG и инкубировали при 16°C, 100 об./мин в течение ночи (~20 ч.). После индукции культуры центрифугировали при 5000 гcf в течение 15 мин для осаждения клеток. Клеточный осадок хранили при -80°C в течение ночи до лизиса. После замораживания/оттаивания клеточный осадок лизировали с помощью 3 мл буфера для лизиса (20 мМ Tris pH 8, 1/4X B-PER™ II, Omni-Cleave™, Ready-Lyse™ и ингибиторов протеаз Halt™) с раскачиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Лизаты клеток осветляли посредством центрифугирования при 13000 гcf в течение 10 мин 2,5 мл каждого осветленного лизата наносили на колонку для обессоливания PD10 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенные с помощью PBS. Полипептид IPD090Ca (SEQ ID NO: 6) элюировали из колонок PD10 с помощью 3,5 мл PBS и лизат подвергали биологическому анализу в отношении WCRW. Средний показатель WCRW для серии разведений из 8 повторностей анализа для полипептида IPD090Ca (SEQ ID NO: 6) показаны в табл. 5.

Таблица 5

Тестируемый образец	Конц. общего лизата белка (мг/мл)	Средн. Показатель WCRW
IPD090Ca (SEQ ID NO: 6)	3,000	2,5
	2,060	2,5
	1,242	2,9
	0,691	2,5
	0,332	2,1
	0,212	2,0
	0,042	1,4
	0,038	0
Контроль в виде буфера PBS	0	0

Пример 8. Экспрессия полипептида IPD090Fa в *E. coli*.

Аминокислотную последовательность IPD090Fa (SEQ ID NO: 8) идентифицировали посредством поиска BLAST™ в общедоступной неизбыточной базе данных белковых последовательностей в NCBI (эталонная последовательность в NCBI: WP_019961352.1).

Соответствующую кодирующую последовательность, оптимизированную для *E. coli* (SEQ ID NO: 7), получали в виде двух перекрывающихся синтетических фрагментов ДНК (IDT, Коралвилль, Айова), концы которых содержали 30 нуклеотидов, гомологичных с pET-24a (Novagen) в сайтах NdeI/XhoI. Вектор экспрессии IPD090Fa с C-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 350) получали с применением NE-Builder™ (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс).

Положительные клоны подтверждали посредством секвенирования ДНК.

Конструкцию экспрессии IPD090Fa с C-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 350) трансформировали в клетки *E. coli* BL21 (DE3, Agilent, Санта-Клара, Калифорния) для экспрессии. Культуры в 250 мл бульона Луриа (содержащего канамицин) выращивали при 37°C до достижения OD₆₀₀, составляющей примерно 0,6, а затем культуры индуцировали с помощью 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид (IPTG) и обеспечивали рост в течение дополнительных 18 ч при 16°C, 250 об./мин. Культуры центрифугировали при 5000 гcf в течение 15 мин для осаждения клеток. Клеточный осадок лизировали с помощью 1/4 реагента B-PER™ II (Thermo Scientific), 20 мМ Tris pH 8,0, эндонуклеазы OmniCleave™ (Epicentre), лизоци-

ма ReadyLyse™ (Epicentre) и смеси ингибиторов протеаз V HALT™ (Millipore) с раскачиванием в течение 120 мин при 30°C. Лизаты осветляли посредством центрифугирования при 13000 gcf в течение 10 мин и супернатанты переносили в 10 мМ имидазол, а затем наносили на отдельные 1 мл колонки Ni-NTA (QIAGEN® Inc., Валенсия, Калифорния, 91355), уравновешенные с помощью Трис-солевого буферного раствора (TBS), 10 мМ имидазола. Колонки промывали два раза с помощью 5 мл 10 мМ имидазола в TBS. Рекомбинантно экспрессированный полипептид IPD090Fa с С-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 351) элюировали из колонок с помощью 1,2 мл 300 мМ имидазола в TBS. 1,2 мл элюата наносили на колонку для обессоливания Zeba Spin (Thermo) и буфер меняли на TBS. Очищенный и обессоленный полипептид IPD090Fa с С-концевой меткой 6X-His (SEQ ID NO: 351) подвергали биологическому анализу в отношении WCRW, и он был активным (табл. 6).

Клеточный осадок из 1 л культуры *E. coli*, экспрессирующей полипептид IPD090Fa (SEQ ID NO: 8), суспендировали в 5X объеме (объем по весу) 20 мМ Tris pH 8,0+1:100 смеси ингибитора протеиназ HALT™ (Thermo). Клетки лизировали при 25000 PSI и лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин. К надосадочной жидкости при перемешивании по каплям добавляли равный объем 3 М сульфата аммония до конечной концентрации 1,5 М и обеспечивали перемешивание раствора в течение по меньшей мере 30 мин. После осветления загружали надосадочную жидкость в колонку Phenyl-5PW (Tosoh Bioscience, Кинг оф Пруссия, Пенсильвания), уравновешенную в 1,5 М сульфате аммония, 20 мМ Tris, pH 8,0. Колонку промывали 4-кратным объемом колонки (CV) и фракции, содержащие полипептид IPD090Fa (SEQ ID NO: 8), элюировали с помощью 15 CV градиента к 20 мМ Tris, pH 8,0. Элюат с полипептидом IPD090Fa (SEQ ID NO: 8) загружали на колонку Mono Q™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенную в 20 мМ Tris-буфере pH 8,0, и фракции, содержащие IPD090Fa, элюировали с помощью 40 CV градиента к 0,5 М NaCl, 20 мМ Tris pH 8,0, концентрировали, и дополнительно очищали посредством эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex™ 200 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенной в PBS. На основании SDS-PAGE объединяли фракции с очищенным полипептидом IPD090Fa (SEQ ID NO: 8).

Пример 9. Биологические анализы на основе рациона с использованием кукурузного жука для определения LC50 и IC50.

Биологические анализы с внедрением стандартизованного рациона для кукурузного жука использовали для тестирования активности полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в отношении WCRW. Рацион для кукурузного жука получали согласно рекомендации производителя в отношении рациона для *Diabrotica* (Frontier, Ньюарк, Делавэр). Тест включал шесть различных доз полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) плюс контроль в виде буфера с 32 наблюдениями для каждой дозы в каждом биологическом анализе. Новорожденных особей помещали в 96-луночные планшеты, содержащие смесь полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) (5 мкл/лунка) и рациона (25 мкл/лунка), при этом каждая лунка содержала примерно 5-8 личинок (<24 ч. после вылупливания). Через один день по одной личинке переносили в каждую лунку второго 96-луночного планшета, содержащего смесь полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) (20 мкл/лунка) и рациона (100 мкл/лунка) в той же концентрации, что и обработка, которой подвергали насекомое в первый день. Планшеты инкубировали при 27°C, 65% RH в темноте в течение 6 дней. Рассчитывали 50% летальной концентрации для полипептидов в биологическом анализе с применением программы-надстройки для Excel для определения эффекта дозы "Dose Response Add-In for Excel" на основе пробит-анализа. Смертность и число серьезных остановок развития оценивали и объединяли как общий ответ для расчета подавления 50% отдельных особей с применением того же способа. LC50 и IC50 в отношении WCRW (*Diabrotica virgifera virgifera*) составляли 16,3 ppm и 7,4 ppm, соответственно, а в отношении NCRW (*Diabrotica barberi*) составляли 35,6 ppm и 13 ppm, соответственно. В отношении *Diabrotica speciosa* LC50 составляла >400 ppm, а IC50=320 ppm. Такой же протокол анализа применяли для оценки токсичности полипептида IPD090Aa с С-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 349) и полипептида IPD090Fa с С-концевой 6X-His (SEQ ID NO: 351) в отношении WCRW и NCRW. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Насеко мое	Образец	LC/IC	ppm	Ниже 95% CL	Выше 95% CL	Наклон	N
WCRW	IPD090Aa с С-конц.	LC50	42,0	31,8	63,9	2,1	128,0
	6xHis (SEQ ID NO: 349)	IC50	17,6	14,2	21,9	2,6	158,0
	IPD090Fa с С-конц.	LC50	9,0	7,0	11,3	2,4	186,0
	6xHis (SEQ ID NO: 351)	IC50	5,7	4,4	7,0	2,7	154,0
NCRW	IPD090Aa с С-конц.	LC50	100,2	69,7	122,6	7,9	47,0
	6xHis (SEQ ID NO: 349)	IC50	54,4	36,4	81,7	2,6	79,0
	IPD090Fa с С-конц.	LC50	13,9	10,5	18,2	3,4	79,0
	6xHis (SEQ ID NO: 351)	IC50	9,2	6,5	12,0	4,0	63,0

Пример 10. Тестирование перекрестной устойчивости у отобранного по mCry3A WCRW.

LC50 также определял для полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в отношении WCRW, устойчивого к mCry3A, и сравнивали с восприимчивым WCRW с применением того же способа, что и биологические анализы на основе рациона для WCRW, описанного в примере 8 выше. Линию WCRW, устойчивую к mCry3A, разрабатывали посредством отборов на трансгенных растениях маиса с высоким уровнем экспрессии mCry3A (>10000 нг/мг общего растворимого белка в корнях T0) и высокой эффективностью в отношении WCRW. Соотношение устойчивости (RR) к mCry3A у колонии было в >92 раза выше, исходя из LC50 в анализе на основе рациона (публикация заявки патента № US 20140033361). RR рассчитывали следующим образом: $RR = (LC50 \text{ устойчивого WCRW}) / (LC50 \text{ восприимчивого WCRW})$. В табл. 7 показано, что линия WCRW, устойчивая к mCry3A, не имела перекрестной устойчивости (RR=1,4-кратная) к полипептиду IPD090Aa (SEQ ID NO: 2).

Таблица 7

Колония WCRW	n	IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), (мкг/мл)	95% CL	Наклон (SE)	Соотношение устойчивост и (RR)
Контроль	230	25,4	19,3- 34,5	1,8 (0,3)	1,0
mCry3A- res*	240	35,3	26,5- 46,5	2,3 (0,4)	1,4

Пример 11. Химеры между гомологами IPD090.

Для получения активных вариантов полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) с диверсифицированными последовательностями получали химерные гены между IPD090Aa (SEQ ID NO: 1) и IPD090Ca (SEQ ID NO: 5) посредством сборки множественных перекрывающихся ПЦР-фрагментов. Для данной цели нуклеотидную последовательность IPD090Ca кодон-гармонизировали с последовательностью IPD090Aa, что повышает гомологию ДНК для обеспечения шаффлинга семейства и конструирования химеры. Кодирующая последовательность IPD090Ca с модифицированным кодоном содержит последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 345. Всего семь химерных полинуклеотидов IPD090Aa/IPD090Ca конструировали и клонировали в pET24a. Конструкции трансформировали в BL21 DE3 и культивировали на 48-луночных планшетах для экспрессии белка. Лизаты клеток получали с помощью реагента для экстракции белка B-PER® от Thermo Scientific (3747 N. Meridian Rd., Рокфорд, Иллинойс, США 61101) и подвергали скринингу в отношении инсектицидной активности в отношении WCRW. В табл. 8 показаны границы химерного белка и процент идентичности последовательности с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2).

Таблица 8

Обозначение химеры	Полинуклеотид	IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) N-конц. фрагмент	IPD090Ca (SEQ ID NO: 6) C-конц. фрагмент	% идентичности посл. с IPD090Aa	Активность в отношении WCRW
Химера 1 SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 11	M1-A239	R241-K483	88,6	Да
Химера 2 SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 13	M1-V296	P297-K483	90,9	Да
Химера 3 SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 15	M1-G348	D349-K483	93,8	Да
Химера 4 SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 17	M1-Q382	A383-K483	94,8	Да
Химера 5 SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 19	M1-G422	A423-K483	97,7	Да
Химера 6 SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 21	M1-K442	I443-K483	98,8	Да
Химера 7 SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 23	M1-Q144	S146-K483	86,5	Да

Пример 12. Варианты IPD090Aa с множественными аминокислотными заменами.

Для создания вариантов полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) с множественными изменениями аминокислот получали библиотеки вариантов с помощью шаффлинга семейств (Chia-Chun J. Chang et al, 1999, Nature Biotechnology 17, 793-797) полинуклеотидов, кодирующих IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) и IPD090Ca (SEQ ID NO: 6).

Три библиотеки конструировали для получения вариантов IPD090Aa. В первой библиотеке полинуклеотидные последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 применяли в качестве источников библиотеки. Во второй библиотеке полинуклеотидные последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 амплифицировали в семи фрагментах с перекрывающейся гомологией. Праймеры, применяемые для амплификации фрагментов, обобщены в табл. 9. Перекрывающиеся фрагменты объединяли и собирали.

Таблица 9

Праймер	Последовательность
90Aa прямой Frag1	GAA GGA GAT ATA CAT ATG GAA MAC RTA GAC TTG CCA CAR GGA CTT GTA AAC TTT TCC (SEQ ID NO: 360)
90Ca прямой Frag1	GAA GGA GAT ATA CAT ATG GAA MAC RTC GAC CTG CCG ACR GGA CTC GTC AAA TTT TCC (SEQ ID NO: 361)
90-2 прямой	TC GTR CCS GAG ATC GTC GAC GTS CAR CAG AAY GAC AGC GCM ASC TAC ACC AAC (SEQ ID NO: 362)
90-2 RC	GTT GGT GTA GST KGC GCT GTC RTT CTG YTG SAC GTC GAC GAT CTC (SEQ ID NO: 363)
90-3 прямой	AAC GAG TTC CAC YCG YAT YCA GCA ATC GAT CAA CCT CTG GTC G (SEQ ID NO: 364)
90-3 RC	ACC GAA GGC ARG CGC ARC GAC CAG AGG TTG ATC GAT TGC TG (SEQ ID NO: 365)
90-4 прямой	ACC GGC ATC GTR ATG GGY GGM CGR GCC ATM CTC GCC KCC TCG GAC CAA C (SEQ ID NO: 366)
90-4 RC	GTT GGT CCG AGG MGG CGA GKA TGG CYC GKC CRC CCA TYA CGA TGC CGG T (SEQ ID NO: 367)
90-5 прямой	TTC CAG GCC TGG GTM GAC AGY GTG RGC RCC TCG CCS GAY TTC GTC GAY TTC GTY CCC ACC ATC CC (SEQ ID NO: 368)
90-5 RC	GGG ATG GTG GGR ACG AAR TCG ACG AAR TCS GGC GAG

	GYG CYC ACR CTG TCK ACC CAG GCC TGG AA (SEQ ID NO: 369)
90-6 прямой	TAC GAC CTC AAT GCC GG (SEQ ID NO: 370)
90-6 RC	CCG GCA TTG AGG TCG TA (SEQ ID NO: 371)
90-7 прямой	TAC AAC ACC GAY ACC GCR ATC AAC AAG (SEQ ID NO: 372)
90-7 RC	CTT GTT GAT YGC GGT RTC GGT GTT GTA (SEQ ID NO: 372)
90Aa Frag 8 обратный	CTC AGT GGT GGT GGT GGT GGT GCT CGA GCT ACT TGC CTA CGA AGG TAC AGG CAT AGA TG (SEQ ID NO: 374)
90Ca Frag 8 обратный	CTC AGT GGT GGT GGT GGT GGT GCT CGA GTT ACT TGC CGA CGA AAG TGC AGG CAT AGA TG (SEQ ID NO: 375)

В третьей библиотеке последовательность нативного полинуклеотида (SEQ ID NO: 1), кодирующую полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), и кодон-оптимизированную последовательность полинуклеотида E. coli (SEQ ID NO: 345), кодирующую полипептид IPD090Ca (SEQ ID NO: 6), применяли в качестве источников библиотеки.

После трансформирования вариантами библиотек клеток E. coli колонии собирали и культивировали в 48-луночных планшетах для экспрессии белка. Лизаты клеток получали с помощью реагента для экстракции белка B-PER® от Thermo Scientific (3747 N Meridian Rd, Рокфорд, Иллинойс, США 61101) и подвергали скринингу в отношении инсектицидной активности в отношении WCRW. Активные варианты секвенировали и идентифицировали аминокислотные замены. В библиотеке 1 подвергали скринингу 144 варианта и идентифицировали последовательность 11 активных уникальных вариантов. В библиотеке 2 подвергали скринингу 96 варианта и идентифицировали последовательность 10 активных уникальных вариантов. В библиотеке 3 подвергали скринингу 168 варианта и идентифицировали последовательность 64 активных уникальных вариантов.

Процентную идентичность последовательности активных вариантов IPD090Aa по сравнению с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) рассчитывали с применением алгоритма Нидлмана-Вунша, реализованного в программе Needle (комплекс инструментов EMBOSS). Процентная идентичность по сравнению с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), обозначение вариантов, нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности полученных в результате активных вариантов полипептида IPD090Aa показаны в табл. 10. В табл. 11 обобщен процент идентичности активных вариантов по сравнению с полипептидом IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), число вариантов с каждой процентной идентичностью и идентификация варианта.

Таблица 10

% идентичности с IPD090Aa (SEQ ID NO: 2)	Вариант	Полинуклеотид	Полипептид
90,5	S04515584	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 114
84,1	S04515608	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 115
89,9	S04515618	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 116
80,2	S04515626	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 117
81,6	S04515631	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 118
82,2	S04515638	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 119
79,8	S04515642	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 120
81,8	S04515648	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 121
94,2	S04515711	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 122
80,8	S04515723	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 123
80	S04515724	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 124
92,1	S04519420	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 125
84,1	S04519434	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 126
83,9	S04519435	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 127
93,4	S04519439	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 128
87,8	S04519446	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 129
83,9	S04519447	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 130
89	S04519473	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 131
96,7	S04519475	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 132
94,2	S04519477	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 133
83,3	S04519504	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 134
96,9	S04529311	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 135

040502

90,7	S04529312	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 136
89,6	S04529313	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 137
88	S04529314	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 138
88,4	S04529317	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 139
89,9	S04529318	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 140
93	S04529319	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 141
92,4	S04529320	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 142
96,1	S04529325	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 143
93,6	S04529326	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 144
91,7	S04529329	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 145
93,6	S04529331	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 146
95,4	S04529338	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 147
96,3	S04529347	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 148
94,8	S04529348	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 149
89,9	S04529351	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 150
89,2	S04529352	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 151
86	S04529353	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 152
97,3	S04529355	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 153
86,2	S04529359	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 154
88,8	S04529361	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 155
95,9	S04529363	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 156
86,8	S04529365	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 157
88	S04529371	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 158
90,5	S04529372	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 159
97,3	S04529374	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 160
96,5	S04529375	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 161
83,9	S04529376	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 162
95,2	S04529377	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 163
96,5	S04529378	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 164
85,1	S04529380	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 165
94,2	S04529383	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 166
92,1	S04529386	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 167
94	S04529390	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 168
86	S04529393	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 169

040502

86,2	S04529396	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 170
92,8	S04529397	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 171
94,2	S04529401	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 172
90,3	S04529402	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 173
92,3	S04529404	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 174
90,3	S04529407	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 175
95	S04529410	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 176
97,5	S04529419	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 177
99,4	S04529422	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 178
95,2	S04529423	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 179
95,2	S04529426	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 180
90,3	S04529432	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 181
91,1	S04529434	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 182
93,6	S04529436	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 183
91,3	S04529437	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 184
93,6	S04529443	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 185
98,3	S04529446	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 186
89,9	S04529447	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 187
96,5	S04529455	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 188
97,7	S04529458	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 189
92,1	S04529460	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 190
91,3	S04529461	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 191
93,8	S04529462	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 192
88	S04529463	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 193
93,6	S04529469	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 194
87,4	S04529471	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 195
87,4	S04529479	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 196
91,1	S04529481	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 197
89,4	S04529483	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 198
87	S04529486	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 199
92,1	S04529493	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 200
95,2	S04529495	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 201
87,4	S04529498	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 202

Таблица 11

№ идент. с IPD090Aa (SEQ ID NO: 2)	Число вариантов	Варианты
99	1	S04529422
98	1	S04529446
97	4	S04529458, S04529419, S04529355, S04529374
96	7	S04529311, S04519475, S04529375, S04529378, S04529455, S04529347, S04529325
95	7	S04529363, S04529338, S04529377, S04529423, S04529426, S04529495, S04529410
94	6	S04529348, S04515711, S04519477, S04529383, S04529401, S04529390
93	8	S04529462, S04529326, S04529331, S04529436, S04529443, S04529469, S04519439, S04529319
92	7	S04529397, S04529320, S04529404, S04519420, S04529386, S04529460, S04529493
91	5	S04529437, S04529481, S04529329, S04529434, S04529461
90	6	S04529312, S04515584, S04529372, S04529402, S04529407, S04529432
89	8	S04515618, S04529318, S04529351, S04529447, S04529313, S04529483, S04529352, S04519473
88	5	S04529361, S04529317, S04529314, S04529371, S04529463
87	5	S04519446, S04529471, S04529479, S04529498, S04529486
86	5	S04529365, S04529359, S04529396, S04529353, S04529393
85	1	S04529380
84	2	S04515608, S04519434
83	4	S04519435, S04519447, S04529376, S04519504
82	1	S04515638
81	2	S04515648, S04515631
80	3	S04515723, S04515626, S04515724
79	1	S04515642

Пример 13. Варианты IPD090Aa с модифицированными физическими свойствами.

Ряд вариантов полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) с модифицированными физическими свойствами создавали посредством способов мутагенеза с применением набора для многостороннего сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ (Agilent).

Олигонуклеотиды конструировали и объединяли для введения консервативных изменений аминокислот I на L и Y на F в выбранных положениях в пределах полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2). Библиотеку экспрессировали в *E. coli* и 204 изолята подвергали скринингу в виде очищенных лизатов в отношении инсектицидной активности в отношении WCRW. Идентифицировали 71 уникальный активных клон WCRW, и они обобщены в табл. 12.

Таблица 12

Вариант	Полинуклеотид	Полипептид	Аминокислотные замены относительно IPD090Aa (SEQ ID NO: 2)
S04509867	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 274	I038L
S04509903	SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 275	I004L, I038L, I375L
S04509914	SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 276	I340L
S04509946	SEQ ID NO: 206	SEQ ID NO: 277	I375L
S04513757	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 278	I080L
S04537215	SEQ ID NO: 208	SEQ ID NO: 279	I080L, Y321F, Y333F, Y434F, I446L, I453L
S04537217	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 280	I080L, I099L, Y321F, Y333F, I353L, Y434F, I453L
S04537221	SEQ ID NO: 210	SEQ ID NO: 281	I080L, Y091F, I099L, I353L, I440L, Y457F
S04537226	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 282	I080L, Y333F, I340L, I446L, Y457F
S04537227	SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO: 283	I080L, I099L, Y333F, Y434F
S04537230	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 284	I080L, Y091F, Y339F, I353L, I440L
S04537235	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 285	I080L, Y091F, Y321F, Y333F, I340L, I346L, I362L, Y434F, I440L
S04537237	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 286	I080L, Y333F, Y434F
S04537243	SEQ ID NO: 216	SEQ ID NO: 287	I080L, I099L, Y339F, Y457F
S04537244	SEQ ID NO: 217	SEQ ID NO: 288	I080L, Y091F, Y333F, I362L, I446L
S04537246	SEQ ID NO: 218	SEQ ID NO: 289	I080L, Y333F, I362L
S04537249	SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 290	I080L, Y091F, Y333F, I440L
S04537256	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 291	I080L, Y091F, I099L, Y321F, Y333F
S04537260	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 292	I080L, I099L, E331K, K332V, Y333P, R334G, V335Q, K336G, A337, N338, Y339, I340, D341, Q342, L343, V344, V345, I346, T347, G348, G349, S350, S351, T352,

		I353,	E354,	P355,
		P356,	V357,	G358,
		Y359,	S360,	K361,
		I362,	E363,	Y364,
		D365,	L366,	N367,
		A368,	G369,	A370,
		G371,	G372,	D373,
		F374,	I375,	Y376,
		L377,	C378,	Y379,
		H380,	E381,	Q382,
		T383,	W384,	Q385,
		A386,	D387,	R388,
		P389,	K390,	D391,
		A392,	V393,	T394,
		D395,	I396,	R397,
		I398,	I399,	F400,
		N401,	K402,	E403,
		P404,	T405,	P406,
		P407,	G408,	Y409,
		T410,	K411,	L412,
		P413,	Q414,	D415,
		L416,	N417,	K418,
		G419,	A420,	G421,
		G422,	D423,	D424,
		V425,	F426,	L427,
		C428,	Y429,	K430,
		T431,	E432,	A433,
		Y434,	N435,	T436,
		D437,	T438,	A439,
		I440,	N441,	K442,
		V443,	T444,	V445,
		I446,	G447,	G448,
		N449,	N450,	A451,
		D452,	I453,	N454,
		A455,	P456,	Y457,

040502

			G458, Y459, L460, K461, V462, P463, G464, D465, L466, N467, R468, G469, A470, G471, G472, N473, F474, I475, Y476, A477, C478, T479, F480, V481, G482
S04537262	SEQ ID NO: 222	SEQ ID NO: 293	I362L, I440L
S04537263	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 294	I080L, Y091F, Y333F, I362L
S04537266	SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 295	Y091F, Y321F, I440L
S04537271	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 296	I080L, Y333F, I346L, Y434F, I440L
S04537273	SEQ ID NO: 226	SEQ ID NO: 297	I080L, I099L, Y321F, Y333F, I362L, I440L
S04537275	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 298	I080L, Y339F
S04537281	SEQ ID NO: 228	SEQ ID NO: 299	I080L, I099L, Y333F, I353L, Y434F, I446L
S04537282	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 300	I080L, Y333F, I440L
S04537285	SEQ ID NO: 230	SEQ ID NO: 301	I080L, Y091F, Y333F, I346L, I440L, Y457F
S04537286	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 302	I080L, I340L, I362L, Y434F
S04537292	SEQ ID NO: 232	SEQ ID NO: 303	I080L, I340L, I346L, I362L, Y434F
S04537293	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 304	I080L, I099L, Y333F, I353L
S04537294	SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 305	I080L, I099L, I346L, I362L, I440L

S04537296	SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 306	I080L, Y091F, I099L, Y321F, Y333F, I340L, S350I, S351Q, T352P, I353S, E354N, P355H, P356R, V357S, G358A, Y359T, S360A, K361R, I362S, E363S, Y364T, D365T, L366S, N367M, A368P, G369V, A370P, G371A, G372V, D373T, F374S, I375S, Y376T, L377C, C378A, Y379I, H380T, E381N, Q382K, T383P, W384G, Q385R, A386P, D387T, R388G, P389L, D391M, A392L, V393, T394, D395, I396, R397, I398, I399, F400, N401, K402, E403, P404, T405, P406, P407, G408, Y409, T410, K411, L412, P413, Q414, D415, L416, N417, K418, G419, A420, G421, G422, D423, D424, V425, F426, L427, C428, Y429, K430, T431, E432, A433, Y434, N435, T436, D437, T438, A439, I440, N441, K442, V443, T444, V445, I446, G447, G448, N449,
-----------	-------------------	----------------	---

040502

			N450, A451, D452, I453, N454, A455, P456, Y457, G458, Y459, L460, K461, V462, P463, G464, D465, L466, N467, R468, G469, A470, G471, G472, N473, F474, I475, Y476, A477, C478, T479, F480, V481, G482
S04537298	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 307	I080L, I340L, I362L, D437A, T438P, A439H, I440S, N441T, K442R, V443S, T444R, V445S, I446S, G447A, G448A, N449T, N450M, A451R, D452I, I453S, N454T, A455L, Y457L, G458V, Y459I, L460, K461, V462, P463, G464, D465, L466, N467, R468, G469, A470, G471, G472, N473, F474, I475, Y476, A477, C478, T479, F480, V481, G482
S04537300	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 308	Y333F, I340L, I362L
S04537301	SEQ ID NO: 238	SEQ ID NO: 309	I080L, Y091F, I340L
S04537303	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 310	Y091F, Y333F, I446L
S04537304	SEQ ID NO: 240	SEQ ID NO: 311	I080L, Y091F, Y333F, Y434F

040502

S04537305	SEQ ID NO: 241	SEQ ID NO: 312	Y091F, Y333F
S04537309	SEQ ID NO: 242	SEQ ID NO: 313	I080L, Y091F, I099L, Y339F, I346L, I353L, Y434F, I440L, Y457F
S04537312	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 314	I080L, Y091F, K319S, H320I, Y321S, D322M, D323T, V324S, W325G, A326R, P327R, A328R, Q329N, S330R, E331K, K332S, Y333S, R334G, V335S, K336R, A337L, N338T, Y339T, I340S, D341T, Q342N, L343W, V344W, V345S, I346S, T347P, G348A, G349V, S350V, S351Q, T352P, I353S, E354N, P355H, P356R, V357S, G358A, Y359T, S360A, K361S, I362S, E363S, Y364T, D365T, L366S, N367M, A368P, G369V, A370P, G371A, G372V, D373T, F374S, I375S, Y376T, L377C, C378A, Y379I, H380T, E381N, Q382K, T383P, W384G, Q385R, A386P, D387T, R388G, P389L, D391M, A392L, V393, T394, D395, I396, R397, I398, I399, F400, N401, K402, E403, P404, T405, P406, P407,

040502

			G408, Y409, T410, K411, L412, P413, Q414, D415, L416, N417, K418, G419, A420, G421, G422, D423, D424, V425, F426, L427, C428, Y429, K430, T431, E432, A433, Y434, N435, T436,
			D437, T438, A439, I440, N441, K442, V443, T444, V445, I446, G447, G448, N449, N450, A451, D452, I453, N454, A455, P456, Y457, G458, Y459, L460, K461, V462, P463, G464, D465, L466, N467, R468, G469, A470, G471, G472, N473, F474, I475, Y476, A477, C478, T479, F480, V481, G482
S04537314	SEQ ID NO: 244	SEQ ID NO: 315	I080L, I099L, I346L, I440L
S04537315	SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 316	I080L, Y091F, Y321F, Y333F
S04537319	SEQ ID NO: 246	SEQ ID NO: 317	I080L, I099L, Y333F, I362L, I453L
S04537321	SEQ ID NO: 247	SEQ ID NO: 318	Y091F, Y333F, I440L, Y457F
S04537322	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 319	I080L, Y091F, I099L,

040502

	248		I346L, I362L, Y434F, I440L
S04537325	SEQ ID NO: 249	SEQ ID NO: 320	I080L, Y091F, I099L, Y321F, I346L, Y434F, Y457F
S04537326	SEQ ID NO: 250	SEQ ID NO: 321	I080L, Y091F, I099L, A316P, M317C, R318A, K319S, H320I, Y321S, D322M, D323T, V324S, W325G, A326R, P327R, A328R, Q329N, S330R, E331K, K332S, Y333S, R334G, V335S, K336R, A337L, N338T, Y339T, I340S, D341T, Q342N, L343W, V344W, V345S, I346S, T347P, G348A, G349V, S350V, S351Q, T352P, I353S, E354N, P355H, P356R, V357S, G358A, Y359T, S360A, K361R, I362S, E363S, Y364T, D365T, L366S, N367M, A368P,
			G369V, A370P, G371A, G372V, D373T, F374S, I375S, Y376T, L377C, C378A, Y379I, H380T, E381N, Q382K, T383P, W384G, Q385R, A386P, D387T, R388G, P389L, D391M, A392L, V393, T394, D395, I396, R397, I398, I399, F400, N401, K402,

040502

			E403, P404, T405, P406, P407, G408, Y409, T410, K411, L412, P413, Q414, D415, L416, N417, K418, G419, A420, G421, G422, D423, D424, V425, F426, L427, C428, Y429, K430, T431, E432, A433, Y434, N435, T436, D437, T438, A439, I440, N441, K442, V443, T444, V445, I446, G447, G448, N449, N450, A451, D452, I453, N454, A455, P456, Y457, G458, Y459, L460, K461, V462, P463, G464, D465, L466, N467, R468, G469, A470, G471, G472, N473, F474, I475, Y476, A477, C478, T479, F480, V481, G482
S04537328	SEQ ID NO: 251	SEQ ID NO: 322	I080L, Y091F, Y321F, I340L, Y434F, I440L
S04537330	SEQ ID NO: 252	SEQ ID NO: 323	I080L, Y091F, Y333F, I446L
S04537332	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 324	I080L, Y091F, Y333F, Y457F
S04537334	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 325	I080L, I340L, I440L, Y457F

S04537337	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 326	I080L, Y091F, Y333F
S04537339	SEQ ID NO: 256	SEQ ID NO: 327	Y091F, Y333F
S04537347	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 328	I080L, Y321F, Y333F, I440L, Y457F
S04537349	SEQ ID NO: 258	SEQ ID NO: 329	I080L, Y333F, I446L
S04537350	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 330	I080L, Y091F, Y333F, I446L
S04537351	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 331	I080L, I340L, I440L
S04537352	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 332	Y091F, Y333F, I346L, Y434F, Y457F
S04537359	SEQ ID NO: 262	SEQ ID NO: 333	I080L, Y091F, Y339F, I346L, Y434F
S04537360	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 334	I080L, I099L, Y333F, I362L, Y434F
S04537367	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 335	I080L, Y091F, Y333F
S04537369	SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 336	I080L, Y091F, I099L, Y333F, Y339F, I346L, I353L, I362L, I440L
S04537371	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 337	I080L, Y091F, I099L, Y321F, Y333F, Y339F, I346L, Y434F, I453L
S04537373	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 338	I080L, Y321F, Y333F, Y434F, I446L
S04537377	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 339	I080L, Y091F, A239T, Y339F, I453L
S04537385	SEQ ID NO: 269	SEQ ID NO: 340	I080L, Y333F, Y434F, Y457F
S04537389	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 341	I080L, Y321F, Y333F, I453L
S04537400	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 342	I080L, Y091F, Y333F, I353L
S04537401	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 343	I080L, I099L, Y333F, I353L, I440L
S04537402	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 344	I080L, Y091F, Y333F, I446L

Пример 14. Механизм действия.

Биологическая активность очищенного рекомбинантного белка, включенного в искусственный рацион, показала токсичность полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в отношении личинок WCRW. Чтобы понять механизм токсичности полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), специфическое связывание очищенного белка с тканями средней кишки WCRW оценивали посредством анализов конкуренции *in vitro*. Среднюю кишку извлекали из личинок WCRW третьего возраста для получения мембранных везикул щеточной каймы (BBMV), следуя способу, модифицированному по Wolfersberger et al. (Comp Bioch Physiol 86A: 301-308, 1987), используя аминопептидазную активность для отслеживания обогащения. BBMV представляют собой компонент апикальной мембраны эпителиальных клеток, выстилающих ткань средней кишки насекомых, и, таким образом, служат в качестве модельной системы того, каким образом инсектицидные белки взаимодействуют внутри кишки после поглощения.

Полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) повторно очищали посредством анионообменной хроматографии с применением АКТА™ Purifier 10 (GE Life Sciences) с коллектором фракции Frac-950. Аликвоту очищенного полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) из примера 4 забирали из хранилища с -80°C и подвергали диализу в течение 1 ч. при 4°C относительно 20 мМ CAPS pH 9,6 ('элюент А') и загружали в 1 мл колонку HiTrap™ Q FF (GE Life Sciences), уравновешенную в элюенте А. Применяли 30-кратный объем колонки градиента 0-50% элюента В (20 мМ CAPS pH 9,6+1 М NaCl) при 1 мл/мин. Фракции возле вер-

хушки пика элюирования объединяли и подвергали диализу в буфере для связывания (50 мМ хлорида натрия, 2,7 мМ хлорида калия, 8,1 мМ моногидрофосфата натрия и 1,47 мМ дигидрофосфата калия, pH 7,5).

Очищенный полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) метили с помощью Alexa-Fluor® 488 (Life Technologies) и невключенный флуорофор отделяли от меченого белка с помощью смолы для замены буфера (Life Technologies, A30006) в соответствии с рекомендациями производителя. До проведения экспериментов по связыванию количество белков оценивали с помощью измерения оптической плотности в геле с последующим окрашиванием с помощью Simply Blue® (Thermo Scientific) разделенных на SDS-PAGE образцов, которые включали BSA в качестве стандарта.

Для демонстрации специфического связывания и оценки аффинности BBMV (5 мкг) инкубировали с 6,3 нМ меченого Alexa полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в 100 мкл буфера для связывания в течение 1 ч. при RT в отсутствие и присутствии 13 мкМ немеченого полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2). Центрифугирование при 2 000xg применяли для осаждения BBMV для отделения несвязанного полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2), оставшегося в растворе. Затем осадок BBMV дважды промывали буфером для связывания для удаления оставшегося несвязанного полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2). Конечный осадок BBMV (со связанным флуоресцентным белком) солиubilizировали в восстанавливающем буфере Лэммли для образцов, нагревали до 100°C в течение 5 мин и подвергали SDS-PAGE с использованием 4-12% Bis-Tris полиакриламидных гелей (Life Technologies). Количество меченого Alexa полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в геле из каждого образца измеряли посредством цифровой системы визуализации флуоресценции (ImageQuant™ LAS4000 – GE Healthcare). Оцифрованные изображения анализировали с помощью программного обеспечения для измерения оптической плотности (Phoretix™ ID, TotalLab, Ltd.). На фиг. 2 показано, что полипептид IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) специфично связывается с 5 мкг BBMV WCRW.

Пример 15. Конструкции вектора для экспрессии полипептидов IPD090Aa в растениях.

Векторы экспрессии у растений конструировали со включением трансгенной кассеты, содержащей две различные генные конструкции, кодирующие полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 377, и одну генную конструкцию, кодирующую полипептид IPD090 с SEQ ID NO: 10, под контролем убиквитинового промотора маиса (Christensen, et al., 1992, Christensen and Quail 1996) и связанную с терминатором PINII (Keil et al., 1986, Nucleic Acids Research 14: 5641-5650; An et al., 1989, The Plant Cell 1: 115-122). Полученные в результате конструкции, PHP73234, PHP73237, для полипептида IPD090 с SEQ ID NO: 377 и PHP77372 для полипептида IPD090 с SEQ ID NO: 10, применяли для получения трансгенных объектов маиса для тестирования эффективности в отношении кукурузного жука при условии экспрессии данных полипептидов.

Пример 16. Опосредованная Agrobacterium трансформация маиса и регенерация трансгенных растений.

Для опосредованной Agrobacterium трансформации маиса векторами экспрессии PHP73234, PHP73237 и PHP77372 использовали способ по Zhao (патент США № 5981840 и публикация заявки на патент согласно РСТ № WO 1998/32326; содержание которых включено тем самым посредством ссылки). Вкратце, из маиса выделяли незрелые зародыши, и зародыши приводили в контакт с суспензией Agrobacterium в условиях, при которых бактерии были способными переносить векторы PHP73234, PHP73237 и PHP77372 по меньшей мере в одну клетку по меньшей мере одного из незрелых зародышей (стадия 1: стадия инфицирования). На этой стадии незрелых зародышей погружали в суспензию Agrobacterium для инициации инокуляции. Зародыши в течение некоторого времени культивировали совместно с Agrobacterium (стадия 2: стадия совместного культивирования). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде после стадии инфицирования. После периода совместного культивирования предполагалась необязательная стадия "покоя". На этой стадии покоя зародыши инкубировали в присутствии по меньшей мере одного антибиотика, который, как известно, подавляет рост Agrobacterium, без добавления селективного средства для трансформации растений (стадия 3: стадия покоя). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде с антибиотиком, но без селективного средства, для элиминации Agrobacterium и в течение фазы покоя для инфицированных клеток. Затем, инокулированные зародыши культивировали на среде, содержащей селективное средство, и выделяли растущий трансформированный каллюс (стадия 4: стадия отбора). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде с селективным средством, что приводило к селективному росту трансформированных клеток. Затем каллюс регенерировали с получением растений (стадия 5: стадия регенерации), и каллюсы, выросшие на селективной среде, культивировали на твердой среде для регенерации растений.

Для выявления полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) и полипептида IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10) в тканях листьев 4 лиофилизированных листовых штампа/образца растирали в порошок и ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащего 0,1% Tween 20 (PBST), 1% бета-меркаптоэтанол, содержащего 1 таблетку/7 мл ингибитора протеиназы Complete Mini (Roche 1183615301). Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин и затем центрифугировали при 4°C, 20000 g в течение 15 мин. К надосадочной жидкости добавляли аликвоту из 1/3 объема 3X буфера для образца NuPAGE® LDS (Invitrogen™ (Кали-

форния, США), 1% бета-меркаптоэтанола, содержащего 1 таблетку/7 мл ингибитора протеиназы Complete Mini. Смесь нагревали при 80°C в течение 10 мин, а затем центрифугировали. Образец надосадочной жидкости загружали на гели 4-12% Bis-Tris Midi с подвижным буфером MES в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen™) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с применением устройства iBlot® (Invitrogen™). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в PBST, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, в течение 2 ч перед инкубацией в течение ночи с очищенным с помощью аффинной хроматографии поликлональным антителом кролика к IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) в PBST в течение ночи. Мембрану трижды промывали PBST, а затем инкубировали в PBST в течение 15 мин, а затем двукратно по 5 мин перед инкубацией в течение 2 ч в PBST с антителом козы к Ig кролика, конъюгированным с HRP, в течение 3 ч. Выявленные белки визуализировали с применением реагентов для вестерн-блоттинга ECL (GE Healthcare № по кат. RPN2106) и визуализировали с применением анализатора люминесцентного изображения (ImageQuant LAS 4 000, GE Healthcare). Для выявления полипептида IPD090Aa (SEQ ID NO: 2) и полипептида IPD090Aa (TR1) (SEQ ID NO: 10) в корнях корни лиофилизировали и 2 мг порошка на образец ресуспендировали в LDS, добавляли 1% бета-меркаптоэтанола, содержащего 1 таблетку/7 мл ингибитора протеиназ Complete Mini. Смесь нагревали при 80°C в течение 10 мин и затем центрифугировали при 4°C, 20000 g в течение 15 мин. Образец надосадочной жидкости загружали на гели 4-12% Bis-Tris Midi с подвижным буфером MES в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen™) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с применением устройства iBlot® (Invitrogen™). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в PBST, содержащем 5% порошка обезжиренного молока, в течение 2 ч перед инкубацией в течение ночи с очищенным с помощью аффинной хроматографии поликлональным антителом кролика к IPD090Aa в PBST в течение ночи. Мембрану три раза промывали PBST, а затем инкубировали в PBST в течение 15 мин, а затем два раза по 5 мин перед инкубацией в течение 2 ч в PBST с антителом козы к Ig кролика, конъюгированным с HRP, в течение 3 ч. Связанные с антителом инсектицидные белки выявляли с применением реагентов для вестерн-блоттинга ECL™ (GE Healthcare, № по кат. RPN2106) и визуализировали с применением анализатора люминесцентного изображения (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare). Трансгенные растения маиса, положительные в отношении экспрессии инсектицидных белков, тестировали в отношении пестицидной активности с использованием стандартных биологических анализов, известных в данной области. Такие способы включали, например, биологические анализы с иссечением корня и биологические анализы целого растения. См., например, публикацию заявки на патент США № US 2003/0120054 и международную публикацию № WO 2003/018810.

Пример 17. Эффективность объектов с полипептидом IPD090 в теплице.

Результаты эффективности T0 в теплице для объектов, полученных из конструкций RHP73234, RHP73237 и RHP77372, показаны на фиг. 3. Эффективность для объектов, полученных из всех 3 конструкций, наблюдали относительно объектов отрицательного контроля ("пустых"), которую оценивали по защите корня от западного кукурузного жука. Защиту корня оценивали на основе количества узлов пораженных корней (CRWNIS=показатель поражения узлов кукурузным жуком), используя способ, разработанный Oleson, et al. (2005) [J. Econ Entomol. 98(1):1-8]. Показатель поражения корня оценивали в баллах от "0" до "3", при этом "0" указывал на отсутствие видимого поражения корня, "1" означал 1 узел корневого повреждения, "2" означало 2 узла корневого повреждения, и "3" означало максимальный показатель в 3 узла корневого повреждения. Средние показатели (например, 1,5) указывают на дополнительную долю узлов повреждения (например, один и половина пораженного узла). На фиг. 3 показано, что большая часть объектов из RHP73234, RHP73237 и RHP77372 демонстрировала лучшие результаты, чем отрицательный контроль, и характеризовалась показателями поражения кукурузным жуком <1,0.

Пример 18. Трехмерная структура IPD090Aa, определенная посредством рентгеноструктурной кристаллографии.

Кристаллы варианта IPD090Aa 1167 выращивали посредством способа висячей капли посредством диффузии в парах при 25°C. Кристаллы получали путем смешивания 2 мкл раствора белка 10 мг/мл и 2 мкл раствора для кристаллизации, содержащего 0,2 М гексагидрата MgCl₂, 0,1 М HEPES, pH 7,5, и 30% PEG 400. Кристаллы устанавливали в 0,5 мМ петлю и обеспечивали криопротекцию посредством добавления ~20% глицерина в раствор для кристаллизации. Их подвергали быстрому замораживанию в жидком N₂ и устанавливали на источник рентгеновских лучей Rigaku Micromax-007 HF в центре макромолекулярной рентгеноструктурной кристаллографии Университета штата Айова. 2,1Å данные собирали с применением детектора сигнальных пластин R-Axis IV++ на расстоянии 165,0 мМ. 60° данные собирали при ширине рабочего поля 0,5°. Дифракционные данные обеспечивали индексом и интегрировали с iMOSFILM (CCP4 GNU License) (Battye, T.G.G, et al. (2011) Acta Cryst. D67, 271-281) (Steller, I et al. (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1036-1040) и масштабировали с применением SCALA (Kabsch, W. 1998) J. Appl. Cryst. 21, 916-924. Структуру определяли с применением программы молекулярного замещения PhaserMR (McCoy, A.J. et al (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658-674). Структуру MASP/белка, подобного перфорину из *Photorhabdus luminescens* (PDB ID 2QP2) (Rosado, C.J. et al. (2007) Science 317, 1548-1551) применяли в качестве модели поиска. Идентифицировали подходящий раствор для функций вращения и трансляции. Последовательность варианта IPD090Aa 1167 затем встраивали в электронную плотность с

применением WinCoot© (Emsley P, et al. (2010) ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY 66, 486-501). Модель улучшали с применением Refmac5 (Murshudov, G. et al. (1996) in the Refinement of Protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend;

Murshudov, G.N. et al. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255) до R-factor=0,236 и R-free=0,267 с >96% аминокислот в допущенных участках карты Рамачандрана. В табл. 13 показаны собранные данные и уточненные статистические характеристики.

Таблица 13

Статистика собранных данных						
Пространственная группа	P4 ₁ 2 ₁ 2					
Разрешение	2,13					
Размеры клетки	a	b	c	α	β	γ
	127,61	127,61	116,12	90	90	90
Отражения	244629					
R _{merge}	10,40%					
Завершенность (%)	99,5					
I/ Σ I	10,8					
Множественность сравнений	4,6					
Уточненные статистические характеристики						
Разрешение (Å)	2,13					
№ отражений	51601					
R _{work} /R _{free}	21,45/24,54					
№ атомов						
Белок	3731					
Вода	184					
Лиганд	1					
В-факторы (Å ²)	32,84					
R.M.S. отклонений						
Значения длины связи (Å)	0,019					
Значения угла связи (°)	1,943					
Карта Рамачандрана						
Благоприятные	95,62%					
Допущенные	3,55%					
Выпадающие значения	0,84%					
Общий Procheck						
G-фактор	-0,1					

Общая структура IPD090Aa напоминает структуру других белков, содержащих мембраноатакующий комплекс/порфирин (МАСРФ). Его N-концевой домен состоит из домена МАСРФ, тогда как С-концевой домен содержит β -призматический домен (фиг. 4). Вторичные структуры метили в соответствии с Rosado et al (2007 Science 317, 1548-1551). Атом Mg⁺ показан в виде сферы в нижней части β -призматического домена. Два кластера спиралей (СН1 и СН2) структурно схожи с трансмембранными спиральями (ТМН1 и ТМН2) токсинов семейства холестерин-зависимых цитотоксинов (CDC). Общая форма N-концевого домена МАСРФ имеет отчасти форму коробки (~42Å x 44Å x 24Å) с центральным L-образным 4-х нитьевым антипараллельным β -слоем и 2 кластерами α -спиралей. 17 N-концевых аминокислот в домене МАСРФ образуют 5-й член центрального L-образного β -слоя, но являются параллельными нити 4 (фиг. 5). Домен МАСРФ из P. luminescens имеет α -спиральный N-конец. С-концевой β -призматический домен расположен в нижней части и под центральным β -слоем. Он соединен с доменом МАСРФ посредством линкера из пяти аминокислот, который принимает β -нить-подобную удлиненную конформацию. β -призматический домен состоит из трех 3-нитьевых антипараллельных β -слоев с 3-х мерной осью, пролегающей через центр домена (фиг. 6). Ион Mg⁺² расположен на данной 3-х мерной оси и координирован с карбонильными атомами остова L365, L415, L465 и карбонильными атомами боковой

цепи N366, N416 и N466. Хотя роль Mg^{+2} в инсектицидной активности не наблюдали, ион Mg^{+2} заполняет анионный пробел в этом местоположении в молекуле и способствует поддержанию расположения 3 антипараллельных β -слоев вокруг 3-х мерной оси.

Приведенное выше описание различных проиллюстрированных вариантов осуществления согласно настоящему изобретению не подразумевается как исчерпывающее или служащее для ограничения объема точной раскрытой формой. Хотя конкретные варианты осуществления и примеры описаны в данном документе для иллюстративных целей, в пределах объема настоящего изобретения возможны различные эквивалентные модификации, что будет понятно специалистам в данной области. Представленные в данном документе идеи можно применять для других целей, отличающихся от примеров, описанных выше. В свете вышеизложенных идей возможны многочисленные модификации и вариации, и, следовательно, они находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Эти и другие изменения можно выполнять в свете вышеизложенного подробного описания. В целом, в следующей формуле изобретения используемые термины не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения.

Полное раскрытие каждого цитируемого документа (в том числе патентов, заявок на патенты, публикаций из журналов, рефератов, руководств, книг или других раскрытий) в разделах "Предпосылки изобретения", "Подробное описание" и "Примеры" включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Были сделаны попытки обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры, концентраций и т.д.), но должны предусматриваться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу; температура приведена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или практически атмосферным.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный инсектицидный полипептид с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 384, или его фрагменты, обладающие инсектицидной активностью, где фрагмент:

(a) содержит аминокислоты 1-315, аминокислоты 1-330, аминокислоты 1-349, аминокислоты 1-450, аминокислоты 25-315, аминокислоты 25-330, аминокислоты 25-349, аминокислоты 25-450 или аминокислоты 25-483 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 384; или

(b) является N-концевым и/или C-концевым усечением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 аминокислот от N-конца и/или C-конца относительно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 384.

2. Рекомбинантный инсектицидный полипептид по п.1(a), где полипептид содержит аминокислоты 25-483 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

3. Рекомбинантный инсектицидный полипептид по п.1, где инсектицидный полипептид соединен с гетерологичной сигнальной последовательностью или транзитной последовательностью.

4. Инсектицидный химерный полипептид, содержащий N-концевой участок первого полипептида с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; и C-концевой участок второго отличающегося полипептида с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, обладающий инсектицидной активностью, где N-концевой участок содержит:

(a) аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотной последовательности из аминокислот 1-144, аминокислот 1-239, аминокислот 1-296, аминокислот 1-348, аминокислот 1-382, аминокислот 1-422, аминокислот 1-442, аминокислот 25-144, аминокислот 25-239, аминокислот 25-296, аминокислот 25-348, аминокислот 25-382, аминокислот 25-422, аминокислот 25-442 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; а C-концевой участок содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности к аминокислотной последовательности из аминокислот 146-483, аминокислот 241-483, аминокислот 297-483, аминокислот 349-483, аминокислот 383-483, аминокислот 423-483 или аминокислот 443-483 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; или

(b) аминокислоты 1-144, аминокислоты 1-239, аминокислоты 1-296, аминокислоты 1-348, аминокислоты 1-382, аминокислоты 1-422, аминокислоты 1-442 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; а C-концевой участок содержит аминокислоты 146-483, аминокислоты 241-483, аминокислоты 297-483, аминокислоты 349-483, аминокислоты 383-483, аминокислоты 423-483 или аминокислоты 443-483 из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

5. Инсектицидная композиция, содержащая по меньшей мере один рекомбинантный инсектицидный полипептид по пп.1, 2 или 3, или химерный полипептид по п.4.

6. Рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий инсектицидный полипептид по пп.1, 2 или 3, или химерный полипептид по п.4.

7. Рекомбинантный полинуклеотид по п.6, где в полинуклеотиде имеются кодоны, оптимизированные для экспрессии в важной с точки зрения сельского хозяйства культуре.

8. Инсектицидная ДНК-конструкция, содержащая рекомбинантный полинуклеотид по п.6, функционально связанный с гетерологичным регуляторным элементом.

9. Трансформированная прокариотическая клетка, придающая устойчивость к вредителям, содержащая полинуклеотид по п.6.

10. Устойчивое к вредителям трансгенное растение, содержащее полинуклеотид по п.6 или 7 или ДНК-конструкцию по п.8.

11. Способ подавления роста или уничтожения насекомого-вредителя или популяции вредителя, включающий:

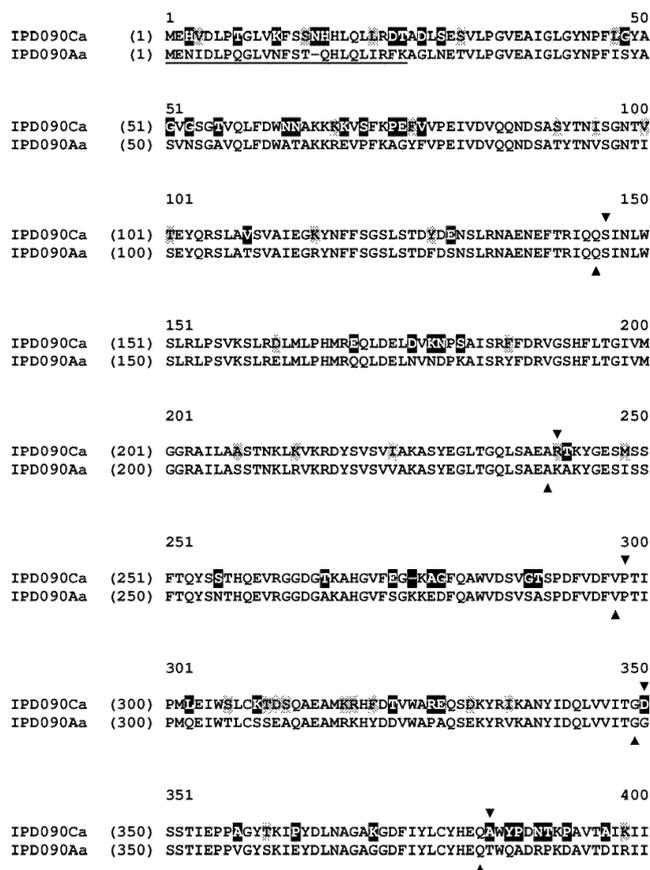
(а) приведение насекомого-вредителя в контакт с инсектицидным полипептидом по пп.1, 2 или 3, или с химерным полипептидом по п.4, или

(б) экспрессию в растении полинуклеотида по п.6 или 7.

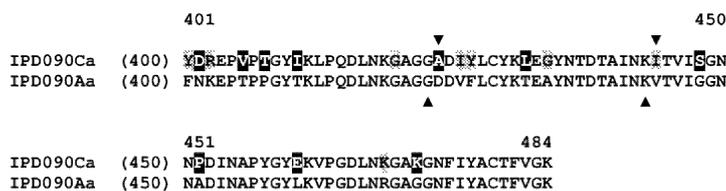
12. Способ по п.11, в котором насекомое-вредитель или популяция вредителя является устойчивой к по меньшей мере одному инсектицидному белку Cry.

13. Рекомбинантный инсектицидный полипептид по п.1, где структура инсектицидного полипептида содержит а) N-концевой домен MACPF и б) C-концевой β -призматический домен.

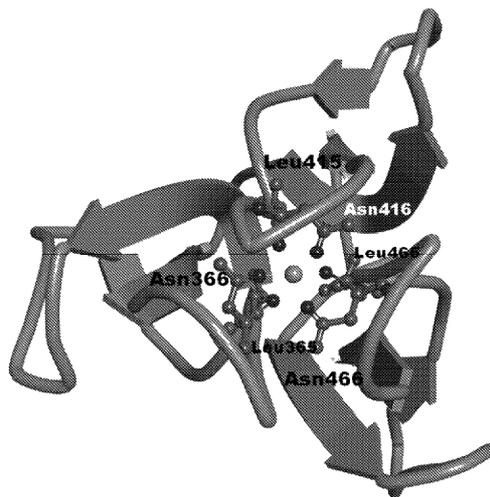
14. Рекомбинантный инсектицидный полипептид по п.1, где инсектицидный полипептид помечен выявляемой меткой.



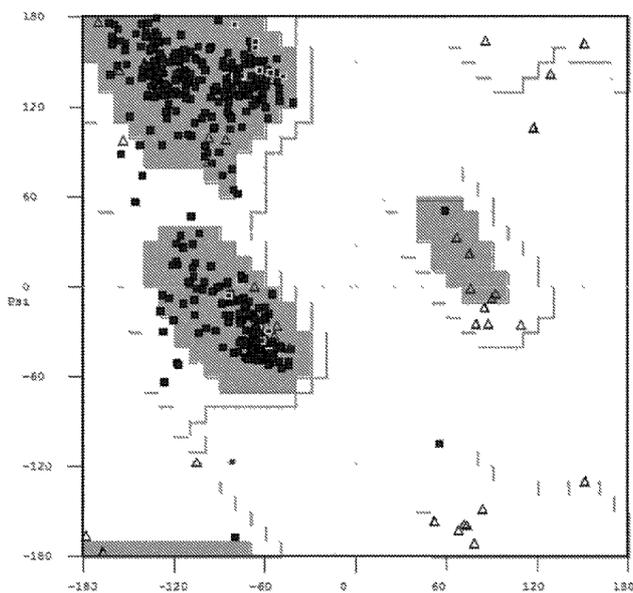
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 6



Фиг. 7