

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041426**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.21**

(51) Int. Cl. **C12N 9/00 (2006.01)**  
**C12N 15/82 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201990549**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.14**

---

(54) **ТРИХОМА-СПЕЦИФИЧНЫЕ ПРОМОТОРЫ ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ  
КАННАБИНОИДОВ И ДРУГИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖЕЛЕЗИСТЫХ ТРИХОМАХ**

---

(31) **62/397,212**

(32) **2016.09.20**

(33) **US**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/US2017/051493**

(87) **WO 2018/057385 2018.03.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**22НД СЕНЧУРИ ЛИМИТЕД, ЛЛС**  
**(US)**

(56) **US-A1-20150315602**  
**US-A1-20160177404**  
**US-A1-20140298511**  
**WO-A1-2016030828**  
**US-B2-8809626**  
**US-A1-20100218283**  
**US-B2-6730826**

(72) Изобретатель:  
**Раштон Пол (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Согласно настоящему изобретению предложены трихома-специфичные промоторы генов фермента биосинтеза каннабиноидов из Cannabis (конопли), нуклеотидные последовательности трихома-специфичных промоторов и варианты применения указанных промоторов для модулирования продукции каннабиноидов и других соединений в организмах. Согласно настоящему изобретению также предложены химерные гены, векторы и трансгенные клетки и организмы, включая клетки растений и растения, содержащие трихома-специфичные промоторы. Также предложены способы экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты в клетках и организмах с применением трихома-специфичных промоторов.

**041426**  
**B1**

**041426**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/397212, поданной 20 сентября 2016 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

#### Область техники

Согласно настоящему изобретению в общем виде предложены трихома-специфичные промоторы генов фермента биосинтеза каннабиноидов из *Cannabis* (конопли), нуклеотидные последовательности трихома-специфичных промоторов и варианты применения промоторов для модулирования продукции каннабиноидов или для модулирования другой трихома-специфичной продукции биохимических веществ в организмах. Согласно настоящему изобретению также предложены трансгенные клетки и организмы, включая клетки растений и растения, содержащие трихома-специфичные промоторы.

#### Уровень техники

Следующее описание представлено для облегчения понимания читателя. Какая-либо представленная информация или какие-либо процитированные источники не признаются представляющими собой известный уровень техники.

Трихомы растений представляют собой эпидермальные выросты, включая разветвленные и неразветвленные волоски, пузырьки, шипы, иглы и жгучие волоски, покрывающие листья, прицветники и стебли. Существует два основных класса трихом, которые можно различить на основании их способности продуцировать и секретировать или накапливать вторичные метаболиты, а именно железистые трихомы и нежелезистые трихомы. Нежелезистые трихомы демонстрируют низкую метаболическую активность и обеспечивают защиту растения, главным образом, с помощью физических средств. Напротив, железистые трихомы, которые присутствуют на листе многих видов растений, включая некоторые виды пасленовых (например, табак, томат), а также коноплю, являются в высокой степени метаболически активными и накапливают метаболиты, которые могут составлять до 10-15% сухой массы листа (Wagner et al., *Ann. Bot.* 93:3-11 (2004)). Железистые трихомы способны секретировать (или накапливать) вторичные метаболиты в качестве механизма защиты.

*Cannabis sativa* L. (конопля, посевная конопля, марихуана), однолетнее травянистое растение, которое культивируют в течение тысяч лет, содержит уникальный набор вторичных метаболитов, называемых каннабиноидами, которые образуют группу терпенофеноловых соединений. Каннабиноиды преимущественно синтезируются и накапливаются в железистых трихомах, присутствующих в большом количестве на женских цветках и в меньшем количестве на мужских цветках растений *C. sativa*. Накопление каннабиноидов в полости запасаания трихом обеспечивает растению преимущество, поскольку каннабиноиды, как известно, являются цитотоксическими для других клеток растений и, как было показано, индуцируют апоптоз в суспензионных культурах клеток посевной конопли и табака (Sirikantaramas et al., *Plant Cell. Physiol.* 46:1578-1582 (2005)). Каннабиноиды образуются в результате трехэтапного биосинтетического процесса: образования поликететида, ароматического пренилирования и циклизации (фиг. 1). Путь синтеза каннабиноидов снабжается гексаноил-КоА, образование которого катализируется гексаноил-КоА-синтетазой. Первый ферментативный этап в биосинтезе каннабиноидов представляет собой образование 3,5,7-триоксодеканойл-КоА ферментом тетракетид-синтазой (tetraketide synthase, TKS), называемой синтазой оливетоловой кислоты (olivetolic acid synthase, OLS1). Второй ферментативный этап в биосинтезе каннабиноидов представляет собой образование оливетоловой кислоты циклазой оливетоловой кислоты (olivetolic acid cyclase, OAC). Следующий этап представляет собой пренилирование оливетоловой кислоты с образованием ароматической пренилтрансферазой каннабигероловой кислоты (cannabigerolic acid, CBGA). CBGA представляет собой центральный промежуточный продукт точки разветвления для биосинтеза различных основных классов каннабиноидов. Альтернативная циклизация пренильной боковой цепи CBGA позволяет получить  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловую кислоту (tetrahydrocannabinolic acid, THCA) или ее изомеры - каннабидиоловую кислоту (cannabidiolic acid, CBDA) или каннабихроменную кислоту (cannabichromenic acid, CBCA). Затем THCA и CBDA декарбоксилируются в процессе неферментативной реакции в течение хранения или курения с образованием  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола (tetrahydrocannabinol, THC) или каннабидиола (cannabidiol, CBD) соответственно (фиг. 1).

Каннабиноиды представляют собой ценные природные вещества растительного происхождения. Препараты конопли, такие как марихуана и гашиш, применяли в течение столетий ввиду их хорошо известных психотропных эффектов. Возобновление интереса к каннабиноидам с точки зрения вариантов медицинского применения было обусловлено способностью данных веществ действовать посредством каннабиноидных рецепторов млекопитающих. Основные каннабиноиды включают  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинол (THC) - соединение, отвечающее за психотропные и терапевтические эффекты потребления марихуаны, и каннабидиол (CBD), который обладает нейропротекторными свойствами. (Gaoni & Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.* 86:1646-1647 (1964); Mechoulam et al., *J. Clin. Pharmacol.* 42:11S-19S (2002)). THCA представляет собой основной каннабиноид в лекарственных разновидностях конопли, тогда как CBDA является преобладающим каннабиноидом в формах посевной конопли, которые выра-

щивают ради волокон или семян. В настоящее время каннабиноиды исследуют для терапевтических целей, включая лечение хронической боли, тошноты, контроля спастического состояния мышц и тремора у пациентов, страдающих от множественного склероза или эпилепсии, а также терапии артрита. Возможность прямой продукции каннабиноидов в трихомах позволяет избежать вмешательства в метаболические пути и характеристики растений. Соответственно, существует потребность в идентификации трихома-специфичных промоторов для модулирования синтеза каннабиноидов в организмах, включая трансгенные растения, трансгенные клетки и их потомков, что позволяет нацеливать экспрессию генов исключительно в трихомах.

### Краткое описание

В настоящем изобретении раскрыты трихома-специфичные промоторы и варианты применения данных промоторов для направления экспрессии кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты в трихомах растений.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из (а) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству Solanaceae. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение Solanaceae представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству Cannabaceae. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение Cannabaceae представляет собой растение *C. sativa*. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула





тивностью, специфичной к железу трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение или клетка растения, содержащие химерный ген, встроенный в геном, причем химерный ген содержит трихома-специфичный промотор, функционально связанный с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, и причем промотор выбран из группы, состоящей из (а) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения.

В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение или клетка растения относится к семейству Solanaceae. В некоторых вариантах реализации растение Solanaceae представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству Cannabaceae. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение Cannabaceae представляет собой *C. sativa*.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ экспрессии полипептида в трихомах растений, включающий: (а) введение в клетку-хозяин вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения; причем последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид; и (b) выращивание растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию полипептида.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ увеличения уровня каннабиноида в трихоме растения-хозяина, включающий: (а) введение в клетку-хозяин вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения; причем последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент пути биосинтеза каннабиноидов; и (b) выращивание растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию фермента пути биосинтеза каннабиноидов; причем экспрессия фермента пути биосинтеза каннабиноидов приводит к получению растения, которое характеризуется повышенным содержанием каннабиноидов по сравнению с контрольным растением, выращенным в подобных условиях.

В некоторых вариантах реализации способа фермент пути биосинтеза каннабиноидов представляет собой синтазу каннабидиоловой кислоты (CBDA), синтазу каннабихроменовой кислоты (CBCA) или синтазу  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA).

В некоторых вариантах реализации способ также включает обеспечение растения каннабигероловой кислотой (CBGA).

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен способ получения генетически сконструированного растения, которое характеризуется повышенным содержанием  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола (THC), каннабихромена (CBC) и/или каннабидиола (CBD) по сравнению с контрольным растением.

Технические решения, описанные и заявленные в настоящем документе, характеризуются множеством свойств и вариантов реализации, включая, без ограничения, таковые, представленные или описанные в данном кратком описании, либо на которые дается ссылка в данном описании. Данное описание не предназначено быть всеобъемлющим, и изобретения, описанные и заявленные в настоящем документе, не ограничены свойствами или вариантами реализации или не ограничиваются свойствами или вариантами реализации, определенными в данном кратком описании, которое включено исключительно с целью иллюстрации, а не ограничения. Дополнительные варианты реализации могут быть раскрыты в подробном описании ниже.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из (a) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 31, 32 или 33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 31, 32 или 33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *C. sativa*.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения любого из 5, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *C. sativa*.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлен путь биосинтеза каннабиноидов, который приводит к образованию основных каннабиноидов в *Cannabis sativa*:  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA) и каннабидиоловой кислоты (CBDA).

На фиг. 2A-2B представлен дизайн промотор:репортерный ген, который использовали в экспериментах, описанных в настоящем документе. Каждый промотор был слит с репортерным геном GUS; активность промотора показана черным цветом после окрашивания (фиг. 2A). Фиг. 2B представляет собой вид трихома-специфичной экспрессии промоторов гена биосинтетического фермента каннабиноидов в трихомах табака в цельном листе. Показаны результаты для иллюстративного промотора (промотора гена CBDA-синтазы 20800). Результаты для других промоторов в пути биосинтеза каннабиноидов являются качественно идентичными (не показаны). На фиг. 2B представлено, что экспрессия репортерного гена ограничена трихомами.

На фиг. 3 представлена трихома-специфичная экспрессия промоторов из полного пути биосинтеза каннабиноидов в трихомах табака. Активность промотора показана черным цветом, обусловленным активностью репортерного гена GUS. Иллюстративный промотор из каждого гена данного пути демонстрирует трихома-специфичную экспрессию, и вследствие этого все промоторы из генов данного пути будут направлять экспрессию в трихомах.

На фиг. 4A представлен дизайн синтетического промотора из 4-кратного фрагмента "Cannabinoid On" (CANON) согласно настоящему изобретению. На фиг. 4B представлена трихома-специфичная экспрессия синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON согласно настоящему изобретению. Активность синтетического промотора показана синим цветом, обусловленным активностью репортерного гена GUS.

## Подробное описание

### I. Введение.

Настоящее техническое решение включает обнаружение последовательностей нуклеиновой кислоты 23 трихома-специфичных промоторов ферментов, участвующих в пути биосинтеза каннабиноидов: (1) промотора оливетол-синтазы (OLS; также называется тетракетид-синтазой); (2) промотора OLS1; (3) промотора OLS2; (4) промотора циклазы оливетоловой кислоты (OAC); (5) промотора OAC1; (6) промотора ароматической пренилтрансферазы (prenyltransferase, PT); (7) промотора PT1; (8) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1); (9) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1'); (10) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE3); (11) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE12); (12) промотора CBDA-синтазы (CBDAS); (13) промотора CBDA-синтазы 1 (CBDAS1); (14) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800; (15) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800'; (16) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603; (17) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603'; (18) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320; (19) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320'; (20) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330; (21) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330'; (22) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498 и (23) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498'.

Были определены последовательности нуклеиновой кислоты для каждого промотора. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора оливетол-синтазы (OLS), (ii) промотора OLS1 и (iii) промотора OLS2 представлены в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и открытая рамка считывания (ORF) OLS представлена в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора циклазы оливетоловой кислоты (OAC) представлена в SEQ ID NO: 5, последовательность нуклеиновой кислоты промотора OAC1 представлена в SEQ ID NO: 6, и ORF OAC представлена в SEQ ID NO: 7. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора ароматической пренилтрансферазы (PT) представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность нуклеиновой кислоты промотора PT1 представлена в SEQ ID NO: 9, и ORF PT представлена в SEQ ID NO: 10. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1), (ii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1'); (iii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE3) и промотора (iv) гексаноил-КоА-синтетазы (AAE12) представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14 соответственно, и ORF гексаноил-КоА (AAE-1) представлена в SEQ ID NO: 15. Последовательности нуклеиновой кислоты промотора (i) CBDA-синтазы (CBDAS), (ii) промотора CBDA-синтазы I (CBDAS1), (iii) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800 и (iv) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800' представлены в SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19 соответственно, и последовательность нуклеиновой кислоты ORF CBDA-синтазы (CBDAS) представлена в SEQ ID NO: 20. Последовательности нуклеиновой кислоты промотора (i) THCA-синтазы (THCAS) 19603, (ii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603', (iii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320, (iv) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320', (v) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330 и (vi) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330' представлены в SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 и 26 соответственно, и ORF THCAS представлена в SEQ ID NO: 27. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498 представлена в SEQ ID NO: 28, последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498' представлена в SEQ ID NO: 29, и ORF CBDA-синтазы (CBDAS) представлена в SEQ ID NO: 30.

Настоящее техническое решение также включает обнаружение последовательностей нуклеиновой кислоты фрагмента промотора "cannabinoid on", или "CANON", который является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии. Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента CANON, который является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в железистых трихомах, представлена в SEQ ID NO: 31. Последовательность нуклеиновой кислоты синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON, содержащего четыре копии консенсусного фрагмента CANON, представлена в SEQ ID NO: 33.

С учетом известных цитотоксических эффектов каннабиноидов, таких как THC, в отношении клеток растений экспрессия генов, управляющих продукцией каннабиноидов под сильным убиквитинным промотором, таким как 35S вируса мозаики цветной капусты (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), может привести к нарушению метаболических путей в целом растении и может иметь пагубные последствия для развития и физиологии растений. Таким образом, трихомы в качестве обособленных объектов с ограниченным взаимодействием с остальной частью растения представляют собой потенциальную цель для метаболической инженерии.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает не исследованные ранее трихома-специфичные промоторы из генов биосинтеза каннабиноидов или биологически активные фрагменты указанных промоторов, которые можно применять для генетического манипулирования синтезом каннабиноидов (например, THC, CBD, CBC, CBG) в растениях-хозяевах, таких как *C. sativa*, растениях семейства Solanaceae и в других семействах и видах растений, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

### II. Определения.

Все технические термины, используемые в настоящем описании, общепринято используются в биохимии, молекулярной биологии и сельском хозяйстве; следовательно, данные термины понятны специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Данные технические термины можно

найти, например, в руководствах *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook and Russel (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001); *Current Protocols In Molecular Biology*, ed. Ausubel et al. (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988) (включая периодические обновленные издания); *Short Protocols In Molecular Biology: A Compendium Of Methods From Current Protocols In Molecular Biology* 5th ed., vol. 1-2, ed. Ausubel et al. (John Wiley & Sons, Inc., 2002); *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, vol. 1-2, ed. Green et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997). Методологии, включающие методики биологии растений, описаны в настоящем документе, а также подробно описаны в монографиях, таких как *Methods In Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*, ed. Maliga et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1995).

"Химерная нуклеиновая кислота" включает кодирующую последовательность или ее фрагмент, присоединенную к нуклеотидной последовательности, отличающейся от нуклеотидной последовательности, с которой указанная кодирующая последовательность связана в клетках, в которых она присутствует в природе.

Термин "кодирование" обозначает процесс, посредством которого ген через механизмы транскрипции и трансляции обеспечивает клетке информацию, на основании которой серия аминокислот может быть собрана в конкретную аминокислотную последовательность для образования активного фермента. В связи с вырожденностью генетического кода определенные замены оснований в последовательности ДНК не изменяют аминокислотную последовательность белка.

"Эндогенная нуклеиновая кислота" или "эндогенная последовательность" является "нативной", т.е. природной, для растения или организма, с которым будут проводить манипуляции методами генной инженерии. Данный термин обозначает нуклеиновую кислоту, ген, полинуклеотид, молекулу ДНК, РНК, мРНК или кДНК, которая присутствует в геноме растения или организма, с которым будут проводить манипуляции методами генной инженерии.

"Экзогенная нуклеиновая кислота" обозначает нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, которая была введена в клетку (или предок клетки) усилиями человека. Такая экзогенная нуклеиновая кислота может представлять собой копию последовательности, в природе обнаруживаемой в клетке, в которую она была введена, или фрагмент указанной последовательности.

В настоящем документе "экспрессия" обозначает продукцию продукта РНК путем транскрипции гена или продукцию полипептидного продукта, кодируемого нуклеотидной последовательностью. "Сверхэкспрессия" или "повышающая регуляция" используется для обозначения того, что экспрессия конкретной последовательности гена или ее варианта в клетке или растении, включая все полученные из него растения-потомки, была повышена в результате применения генной инженерии по сравнению с контрольной клеткой или растением.

"Генная инженерия" охватывает любую методологию введения нуклеиновой кислоты или конкретной мутации в организм-хозяин. Например, растение является генетически сконструированным, если оно трансформировано полинуклеотидной последовательностью, которая супрессирует экспрессию гена, в результате чего экспрессия целевого гена снижается по сравнению с контрольным растением. В контексте настоящего изобретения "генетически сконструированные" включают трансгенные растения и клетки растений. Генетически сконструированное растение или клетка растения может представлять собой продукт любого природного подхода (т.е. не содержащий какие-либо чужеродные нуклеотидные последовательности), реализованного путем введения исключительно последовательностей нуклеиновой кислоты, полученных из вида растения-хозяина или из скрещиваемого вида растения. См., например, заявку на патент США № 2004/0107455.

"Гетерологичная нуклеиновая кислота" или "гомологичная нуклеиновая кислота" обозначает взаимоотношения между последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью и ее клеткой- или организмом-хозяином, в особенности, в контексте трансгенных организмов. Гомологичная последовательность обнаруживается в природе в виде-хозяине (например, растение конопли, трансформированное геном конопли), тогда как гетерологичная последовательность не обнаруживается в природе в клетке-хозяине (например, растение табака, трансформированное последовательностью из растений конопли). Такие гетерологичные нуклеиновые кислоты могут содержать сегменты, которые представляют собой копию последовательности, обнаруживаемой в природе в клетке, в которую ее ввели, или фрагмент указанной последовательности. В зависимости от контекста термин "гомолог" или "гомологичные" может в качестве альтернативы обозначать последовательности, которые являются потомками общей последовательности-предка (например, они могут представлять собой ортологи).

"Повышение", "снижение", "модулирование", "изменение" или т.п. обозначают сравнение с подобным сортом, разновидностью или клеткой, выращенными в подобных условиях, но без модификации, которая приводит к повышению, снижению, модуляции или изменению. В некоторых случаях контроль может представлять собой нетрансформированный контроль, ложно-трансформированный контроль или трансформированный вектором контроль.

Под "выделенной молекулой нуклеиновой кислоты" понимают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которую удалили из ее природного окружения. Например, рекомбинантные молекулы

ДНК, содержащиеся в конструкции ДНК, считают выделенными для целей настоящего технического решения. Следующие примеры выделенных молекул ДНК включают рекомбинантные молекулы ДНК, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или молекулы ДНК, которые являются частично или, по существу, очищенными, в растворе. Выделенные молекулы РНК включают транскрипты РНК *in vitro* молекул ДНК согласно настоящему изобретению. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению также включают такие молекулы, полученные синтетическим способом.

"Растение" представляет собой термин, который охватывает целые растения, органы растения (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, дифференцированные или недифференцированные клетки растений, а также их потомство. Растительный материал включает, без ограничения, семена, суспензионные культуры, зародыши, меристемные области, ткани каллуса, листья, корни, побеги, стебли, плоды, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры.

"Культура клеток растения" обозначает культуры частей растения, таких как, например, протопласты, клетки культуры клеток, клетки в тканях растения, пыльцу, пыльцевые трубки, семяпочки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложена трансгенная культура ткани или трансгенная культура клеток растения, причем трансгенная культура ткани или клеток содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

"Промотор" обозначает область ДНК в направлении 3'-5' от начала транскрипции, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы и других белков для инициации транскрипции. "Конститутивный промотор" является активным в течение всей жизни растения и при большинстве условий окружающей среды. Тканеспецифичный, тканепредпочтительный, специфичный к типу клеток и индуцибельный промоторы образуют класс "неконститутивных промоторов". "Трихома-специфичный промотор" представляет собой промотор, который предпочтительно направляет экспрессию функционально связанного гена в ткани трихом по сравнению с экспрессией в корне, листе, стебле или других тканях растения. "Функционально связанный" обозначает функциональную связь между промотором и второй последовательностью, причем последовательность промотора иницирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Как правило, "функционально связанный" обозначает, что связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются смежными.

"Идентичность последовательности" или "идентичность" в контексте двух полинуклеотидных последовательностей (нуклеиновой кислоты) или полипептидных последовательностей включает указание на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в пределах указанной области. Если процент идентичности последовательности используется применительно к белкам, следует учитывать, что положения оснований, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными заменами аминокислот, когда остатки аминокислот замещены другими остатками аминокислот с подобными химическими свойствами, такими как заряд и гидрофобность, и вследствие этого функциональные свойства молекулы не изменяются. Когда последовательности отличаются консервативными заменами, процент идентичности последовательности можно откорректировать в сторону увеличения с поправкой на консервативную природу замены. Говорят, что последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, характеризуются "подобием последовательности" или "подобием". Средства для осуществления данной корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. Как правило, такие средства включают подсчет консервативной замены как частичного вместо полного несоответствия и посредством этого увеличение процента идентичности последовательности. Таким образом, например, если идентичной аминокислоте присваивают показатель 1, а неконсервативной замене присваивают показатель 0, консервативной замене присваивают показатель от 0 до 1. Балльную оценку консервативных замен вычисляют, например, в соответствии с алгоритмом Мейерса и Миллера, Meyers & Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17 (1988), который реализован в программе PC/GENE (Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Использование в настоящем описании процента идентичности последовательности обозначает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют посредством определения числа положений, в которых в обеих последовательностях обнаружено идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

Термины "супрессия" или "понижающая регуляция" используются в качестве синонимов и обозначают, что экспрессия конкретной последовательности гена или ее варианта в клетке или растении, включая все полученные из него растения-потомки, была понижена в результате применения генной инженерии.

рии по сравнению с контрольной клеткой или растением.

"Трихома" включает в настоящем документе различные типы трихом -железистые трихомы и/или нежелезистые трихомы.

"Клетки трихомы" обозначает клетки, составляющие структуру трихомы, такие как железистые или секреторные клетки, базальные клетки и стебельковые клетки, или "клетки полосы", внеклеточная полость и клетки кутикулы. Трихомы могут также состоять из одной единичной клетки.

"Конопля" или "растение конопли" обозначает любые виды рода *Cannabis*, продуцирующие каннабиноиды, такие как *Cannabis sativa*, и их межвидовые гибриды.

"Вариант" представляет собой нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая отличается от стандартной или данной нуклеотидной или аминокислотной последовательности конкретного гена либо полипептида. Термины "изоформа", "изотип" и "аналог" также обозначают формы "варианта" нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Аминокислотную последовательность, измененную в результате добавления, удаления или замены одной или более аминокислот, или изменение в нуклеотидной последовательности можно считать вариантом последовательности. Вариант полипептида может содержать "консервативные" изменения, при которых замененная аминокислота характеризуется подобными структурными или химическими свойствами, например, замену лейцина изолейцином. Вариант полипептида может содержать "неконсервативные" изменения, например, замену глицина триптофаном.

Аналогичные незначительные вариации могут также включать делеции или инсерции аминокислот или как делеции, так и инсерции. Указания для определения того, какие остатки аминокислот могут быть заменены, встроены или делетированы, можно найти с применением компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники, таких как программное обеспечение Vector NTI Suite (InforMax, MD). Вариант можно также обозначать как "перетасованный ген", такой как гены, описанные в патентах, переуступленных компании Maxugen (см., например, патент США № 6602986).

В настоящем документе термин "приблизительно" будет понятен средним специалистам в данной области техники и будет в некоторой степени варьировать в зависимости от контекста, в котором его используют. Если использование термина не понятно средним специалистам в данной области техники с учетом контекста, в котором используются данные термины, "приблизительно" будет означать до плюс или минус 10% от конкретного термина.

Термин "биологически активные фрагменты", или "функциональные фрагменты", или "фрагменты, обладающие активностью промотора" обозначает фрагменты нуклеиновой кислоты, способные обеспечивать транскрипцию в одном или более типах трихом и/или в одной или более клетках трихом, обнаруженных на одном или более различных типах тканей и органов растения. Биологически активные фрагменты обеспечивают трихома-специфичную и/или по меньшей мере трихома-предпочтительную экспрессию и предпочтительно обладают по меньшей мере подобной силой (или более высокой силой) по сравнению с промотором согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 или 11-15. Силу можно изучить путем трансформации растения таким фрагментом, предпочтительно функционально связанным с репортерным геном, и качественного (пространственно-временная транскрипция) и/или количественного анализа активности промотора в трихомах. В некоторых вариантах реализации сила промотора и/или фрагментов промотора согласно настоящему техническому решению является количественно идентичной или превышает таковую промотора CaMV 35S при измерении в железистых трихомах. В некоторых вариантах реализации биологически активный фрагмент промотора трихом, описанного в настоящем документе, может составлять приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% от полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты промотора. В других вариантах реализации биологически активный фрагмент нуклеиновой кислоты промотора трихом, описанного в настоящем документе, может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот. В третьих вариантах реализации биологически активный фрагмент нуклеиновой кислоты промотора трихом, описанный в настоящем документе, может составлять (1) от приблизительно 10 до приблизительно 554 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS (например, SEQ ID NO: 1); (2) от приблизительно 10 до приблизительно 550 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS1 (SEQ ID NO: 2); (3) от приблизительно 10 до приблизительно 558 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS2 (SEQ ID NO: 3); (4) от приблизительно 10 до приблизительно 996 смежных нуклеиновых кислот для промотора OAC (например, SEQ ID NO: 5); (5) от приблизительно 10 до приблизительно 992 смежных нуклеиновых кислот для промотора OAC1 (например, SEQ ID NO: 6); (6) от приблизительно 10 до приблизительно 1361 смежных нуклеиновых кислот для промотора PT (например, SEQ ID NO: 8); (7) от приблизительно 10 до приблизительно 1357 смежных нуклеиновых кислот для промотора PT1 (например, SEQ ID NO: 9); (8) от приблизительно 10 до приблизительно 805 смежных нуклеиновых кислот для

промотора AAE1-1 (например, SEQ ID NO: 11); (9) от приблизительно 10 до приблизительно 800 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE1-1' (например, SEQ ID NO: 12); (10) от приблизительно 10 до приблизительно 1000 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE3 (например, SEQ ID NO: 13); (11) от приблизительно 10 до приблизительно 869 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE12 (например, SEQ ID NO: 14); (12) от приблизительно 10 до приблизительно 420 смежных нуклеиновых кислот для промотора CBDA-синтазы (например, SEQ ID NO: 16); (13) от приблизительно 10 до приблизительно 416 смежных нуклеиновых кислот для промотора CBDAS1 (например, SEQ ID NO: 17); (14) от приблизительно 10 до приблизительно 535 смежных нуклеиновых кислот для промотора CBDAS 20800 (например, SEQ ID NO: 18); (15) от приблизительно 10 до приблизительно 531 смежных нуклеиновых кислот для промотора CBDAS 20800' (например, SEQ ID NO: 19); (16) от приблизительно 10 до приблизительно 800 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 19603 (например, SEQ ID NO: 21); (17) от приблизительно 10 до приблизительно 796 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 19603' (например, SEQ ID NO: 22); (18) от приблизительно 10 до приблизительно 796 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 50320 (например, SEQ ID NO: 23); (19) от приблизительно 10 до приблизительно 792 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 50320' (например, SEQ ID NO: 24); (20) от приблизительно 10 до приблизительно 720 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 1330 (например, SEQ ID NO: 25); (21) от приблизительно 10 до приблизительно 716 смежных нуклеиновых кислот для промотора THCAS 1330' (например, SEQ ID NO: 26); (22) от приблизительно 10 до приблизительно 804 смежных нуклеиновых кислот для промотора CVCAS 3498 (например, SEQ ID NO: 28); или (23) от приблизительно 10 до приблизительно 800 смежных нуклеиновых кислот для промотора CVCAS 3498' (например, SEQ ID NO: 29). В третьих вариантах реализации биологически активный фрагмент промотора трихом может представлять собой любое количество смежных нуклеиновых кислот между данными двумя количествами, например, без ограничения, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 250, приблизительно 300, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450, приблизительно 500, приблизительно 550, приблизительно 600, приблизительно 650, приблизительно 700, приблизительно 750, приблизительно 800, приблизительно 850, приблизительно 900, приблизительно 950, приблизительно 1000, приблизительно 1050, приблизительно 1100, приблизительно 1150, приблизительно 1200, приблизительно 1250 или приблизительно 1300 смежных нуклеиновых кислот.

III. Генная инженерия клеток- и организмов-хозяев с применением трихома-специфичных промоторов.

#### A. Трихома-специфичные промоторы.

Раскрытие настоящего изобретения включает идентификацию двадцати трех промоторов, которые способны регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, функционально связанных с ними, в клетках трихом.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, причем последовательность нуклеиновой кислоты способна регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, функционально связанных с ней, в клетках трихом. Между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты могут возникать различия в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или где-либо между данными концевыми положениями, введенные между нуклеотидами в эталонной последовательности по отдельности или в одной или более смежных группах в пределах эталонной последовательности.

Настоящее техническое решение также включает биологически активные "варианты" SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 с одним или более удаленными, замещенными, встроенными или добавленными основаниями, причем последовательность нуклеиновой кислоты способна регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, функционально связанных с ней, в клетках трихом. Варианты SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 включают последовательности нуклеиновой кислоты, которые характеризуются идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%,

приблизительно 98%, приблизительно 99% или более с SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 и которые являются трихома-специфичными по своей активности.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения полинуклеотиды (промоторы) модифицируют для создания вариаций в последовательностях молекулы, например для усиления их промоторных активностей, с применением способов, известных в данной области техники, таких как модификация ДНК на основе ПЦР или стандартные методики мутагенеза, либо путем химического синтеза модифицированных полинуклеотидов.

Соответственно, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, могут быть усечены или могут содержать делеции и все еще сохранять способность направлять транскрипцию функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты в трихомах. Минимальную длину области промотора можно определить путем последовательного удаления последовательностей с 5'- и 3'-концов выделенного полинуклеотида с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, включая, без ограничения, удаление фрагментов рестрикционного фермента или расщепление нуклеазами.

Трихома-специфичные промоторы согласно настоящему изобретению также можно применять для экспрессии нуклеиновой кислоты, которая снизит или заингибирует экспрессию нативного гена в растении. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозимы, смысловые агенты супрессии или другие продукты, которые ингибируют экспрессию нативного гена.

Трихома-специфичные промоторы согласно настоящему техническому решению также можно применять для экспрессии белков или пептидов в вариантах применения "молекулярного производства". Такие белки или пептиды включают, без ограничения, промышленные ферменты, антитела, терапевтические средства и продукты питания.

В некоторых вариантах реализации новые гибридные промоторы могут быть разработаны или сконструированы с помощью множества способов. Множество промоторов содержат последовательности в направлении 3'-5', которые активируют, усиливают или определяют силу и/или специфичность промотора. См., например, публикацию Atchison, Ann. Rev. Cell. Biol. 4:127 (1988). Например, гены Т-ДНК содержат "ТАТА"-боксы, определяющие сайт инициации транскрипции, и другие элементы в направлении 3'-5', расположенные в направлении 3'-5' от сайта инициации транскрипции, для модулирования уровней транскрипции.

В. Фрагмент Cannabinoid On (CANON) для трихома-специфичной экспрессии.

В некоторых вариантах реализации раскрытие настоящего технического решения также включает идентификацию молекулы нуклеиновой кислоты, называемой фрагмент "Cannabinoid On" или "CANON", которая достаточна для направления трихома-специфичной экспрессии функционально связанных с ней кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты.

Фрагмент CANON размером 171 пару оснований (SEQ ID NO: 31) представлен ниже в таблице. Консенсусный фрагмент CANON (выделен) представлен в таблице вместе с предполагаемым ТАТА-боксом (жирный шрифт с подчеркиванием), 5'-UTR и стартовым кодоном ("atg", жирный шрифт с подчеркиванием) как SEQ ID NO: 32. Консенсусная последовательность получена из трихома-специфичных промоторов из THCA-синтазы 19603, 1330 и 50320, CBGA-синтазы 3498 и CBDA-синтазы 20800. Фрагмент CANON размером 171 пару оснований (SEQ ID NO: 31) является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в железистых трихомах табака (и конопли).

Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая четыре копии фрагмента CANON перед одной копией минимального промотора (т.е. ТАТ-бокс, начало транскрипции и первый АТГ), называемая "синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON", также представлена в таблице как SEQ ID NO: 33. Первый фрагмент CANON согласно SEQ ID NO: 33 представлен жирным шрифтом, за ним следует второй фрагмент, выделенный подчеркиванием, за ним следует третий фрагмент, представленный жирным шрифтом, и четвертый фрагмент, выделенный подчеркиванием.

## Последовательности фрагмента CANON

<p>Фрагмент Cannabinoid On («CANON») (171 п.о.)  atgatgccaaactattcaatgtacaatgtacatttatttttaataagggttcacctaaca  agggtgcctaattttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  taaaatatttaagtcaatttctttgccccactccaatatataatgt (SEQ ID NO: 31)</p>
<p>Фрагмент CANON с предполагаемым ТАТА-боксом, 5'-UTR и стартовым кодоном (232 п.о.)  atgatgccaaactattcaatgtacaatgtacatttatttttaataagggttcacctaaca  agggtgcctaattttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  taaaatatttaagtcaatttctttgccccactccaatatataatgt <u>tataaata</u>gggataat  tctcaattcatagtaattcaaaaatcattaggactaaagaaaaatg (SEQ ID NO: 32)</p>
<p>Синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON (709 п.о.)  atgatgccaaactattcaatgtacaatgtacatttatttttaataagggttcacctaaca  agggtgcctaattttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  <u>taaaatatttaagtcaatttctttgccccactccatgatgccaaactattcaatgtacaat</u>  <u>gtacatttatttttaataagggttcacctaacaagggtgcctaattttttgtgaacttttt</u>  <u>ttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaatatttaagtcaatttctttgccc</u>  <u>ccccactccatgatgccaaactattcaatgtacaatgtacatttatttttaataagggttcac</u>  <u>cctaacaagggtgcctaattttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgacta</u>  <u>tcaaattataaaaatatttaagtcaatttctttgccccactccatgatgccaaactattcaa</u>  <u>tgtacaatgtacatttatttttaataagggttcacctaacaagggtgcctaattttttgtga</u>  <u>actttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaaatatttaagtcaatt</u>  <u>tctttgccccactccaatatataatgtttataaataggataatttctcaattcatagtaattc</u>  aaaaatcattaggactaaagaaaaatg (SEQ ID NO: 33)</p>

Фрагмент CANON является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в промоторе с приобретением функции. Без конкретного теоретического обоснования считают, что фрагмент CANON отвечает за трихома-специфичную экспрессию множества генов биосинтетического фермента каннабиноидов, включая THCA-, CBDA- и CBCA-синтазы.

## С. Конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации последовательности трихома-специфичного промотора и фрагменты CANON согласно настоящему изобретению или биологически активные фрагменты указанных последовательностей можно встроить в конструкции нуклеиновой кислоты, такие как конструкции экспрессии (т.е. векторы экспрессии), которые могут быть введены и могут реплицироваться в клетке-хозяине, такой как клетка трихом растения. Такие конструкции нуклеиновой кислоты могут содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, функционально связанную с любой из последовательностей промотора или фрагментов CANON согласно настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает применение любого из промоторов или фрагментов CANON, представленных в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или их биологически активных фрагментов для экспрессии гомологичных или гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты в рекомбинантной клетке или организме, таком как клетка растения или растение. В некоторых вариантах реализации данное применение включает функциональное связывание любого из промоторов или фрагментов CANON, представленных в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или их биологически активных фрагментов с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты с образованием конструкции нуклеиновой кислоты и трансформации хозяина, такого как растение или клетка растения. В некоторых вариантах реализации различные гены, которые кодируют ферменты, участвующие в путях биосинтеза для продукции каннабиноидов (например, по меньшей мере одна из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 4, 7, 10, 15, 20, 27 или 30), могут быть подходящими в качестве трансгенов, которые могут быть функционально связаны с трихома-специфичным промотором или фрагментом CANON согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению модулируют экспрессию одного или более белков, которые регулируют биосинтез каннабиноидов. В некоторых вариантах реализации конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению можно применять для модулирования экспрессии каннабиноидов или других соединений (например, терпенов) в клетках трихом.

В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАК), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации линия клеток растений содержит вектор экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой ки-

слоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы. В другом варианте реализации трансгенное растение содержит вектор экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы. В другом варианте реализации предложены способы генетического модулирования продукции каннабиноидов, причем указанные способы включают введение вектора экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы.

В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы. В другом варианте реализации линия клеток растений содержит один или более промоторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы. В другом варианте реализации трансгенное растение содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы. В другом варианте реализации предложены способы генетического модулирования уровня продукции каннабиноидов, причем указанные способы включают введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, который содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (ОАС), ароматической пиренилтрансферазы (РТ), гексаноил-КоА-синтетазы (АЕЕ1-1), СВДА-синтазы, СВСА-синтазы и ТНСА-синтазы.

Конструкции могут содержаться в векторе, таком как вектор экспрессии, приспособленный для экспрессии в соответствующей клетке (растения)-хозяине. Следует понимать, что достаточным будет любой вектор, который позволяет получить растение, содержащее введенную последовательность ДНК.

Подходящие векторы хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в общеизвестных технических руководствах, таких как Pouwels et al., *Cloning Vectors, A Laboratory Manual*, Elsevier, Amsterdam (1986). Были описаны векторы для трансформации растений (см., например, публикацию Schardl et al., *Gene* 61:1-14 (1987)). В некоторых вариантах реализации конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой плазмидный вектор или бинарный вектор. Примеры подходящих векторов включают T1-плазмидные векторы.

Рекомбинантные конструкции нуклеиновой кислоты (например, векторы экспрессии), способные вводить нуклеотидные последовательности или химерные гены под контроль трихома-специфичной регуляторной последовательности (например, промотора, фрагмента CANON), могут быть получены с применением стандартных методик, обычно известных в данной области техники. Для получения химерного гена вектор экспрессии, как правило, содержит функционально связанную в направлении от 5'- к 3'-концу последовательность трихома-специфичного промотора или последовательность CANON, которая направляет транскрипцию гомологичной или гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в направлении 5'-3', за которой необязательно следует 3'-нетранслируемая область нуклеиновой кислоты (3'-UTR), которая кодирует сигнал полиаденилирования, функционирующий в клетках растений, чтобы вызывать терминацию транскрипции и добавление полиаденилатных нуклеотидов к 3'-концу мРНК, кодирующей белок. Гомологичная или гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может

представлять собой последовательность, кодирующую белок или пептид, либо она может представлять собой последовательность, которая транскрибируется в активную молекулу РНК, такую как смысловая и/или антисмысловая РНК, подходящая для сайленсирования гена или семейства генов в клетке- или организме-хозяине. Векторы экспрессии также, как правило, содержат селективируемый маркер. Обычные регуляторные последовательности в направлении 5'-3' содержат сайт инициации транскрипции, участок связывания рибосомы, РНК-процессирующий сигнал, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

В некоторых вариантах реализации векторы экспрессии согласно настоящему техническому решению могут содержать последовательности терминации, расположенные в направлении 5'-3' от молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению, в результате чего транскрипция мРНК останавливается, и добавленные полиА-последовательности. Примеры терминаторов включают терминатор нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos), терминатор маннопинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Tmas) и терминатор CaMV 35S (T35S). Области терминации включают область терминации малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы гороха (TrbcS) или область терминации Tnos. Вектор экспрессии также может содержать энхансеры, стартовые кодоны, сигнальные последовательности сплайсинга и нацеливающие последовательности.

В некоторых вариантах реализации векторы экспрессии согласно настоящему изобретению могут содержать селективный маркер, с помощью которого трансформированные клетки можно идентифицировать в культуре. Маркер может быть связан с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты, т.е. геном, функционально связанным с промотором. В настоящем документе термин "маркер" обозначает ген, кодирующий свойство или фенотип, который позволяет проводить селекцию или скрининг в отношении растения или клетки, содержащих маркер. У растений, например, ген-маркер будет кодировать устойчивость к антибиотику или гербициду. Ген-маркер позволяет проводить отбор трансформированных клеток от клеток, которые не были трансформированы или трансфицированы.

Примеры подходящих селективируемых маркеров включают, без ограничения, аденозиндезаминазу, дигидрофолатредуктазу, гигромицин-В-фосфотрансферазу, тимидинкиназу, ксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу, устойчивость к глифосату и глюфосинату и аминокликозид 3'-О-фосфотрансферазу (устойчивость к канамицину, неомицину и G418). Данные маркеры могут включать устойчивость к G418, гигромицину, блеомицину, канамицину и гентамицину. Конструкция может также содержать селективируемый ген-маркер *bar*, который обеспечивает устойчивость к гербицидным аналогам фосфинотрицина, таким как глюфосинат аммония. См., например, публикацию Thompson et al., *EMBO J.* 9:2519-23 (1987)). Можно также применять другие подходящие селективные маркеры, известные в данной области техники.

Можно применять визуальные маркеры, такие как зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein, GFP). Также были описаны способы идентификации или селекции трансформированных растений на основе контроля деления клеток. См., например, публикации WO 2000/052168 и WO 2001/059086.

Также можно добавить последовательности репликации бактериального или вирусного происхождения для обеспечения клонирования вектора в бактериальном или фаге-хозяине. Предпочтительно применяют прокариотическую точку начала репликации с широким диапазоном хозяев. Можно добавить селективируемый маркер для бактерий для обеспечения отбора бактериальных клеток, несущих желаемую конструкцию. Подходящие прокариотические селективируемые маркеры также включают устойчивость к антибиотикам, таким как канамицин или тетрациклин.

В векторе также могут присутствовать другие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие дополнительные функции, как известно в данной области техники. Например, если хозяином является *Agrobacterium*, можно добавить последовательности Т-ДНК, чтобы способствовать последующему переносу и встраиванию в хромосомы растения.

Способна ли последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению или ее биологически активный фрагмент обеспечивать транскрипцию конкретно в трихомах, и является ли активность "сильной", можно определить с применением различных способов. Для определения пространственно-временной активности промотора или фрагмента CANON (т.е. того, является ли промотор или фрагмент CANON активным в определенной ткани или органе (например, трихомах, либо в определенных условиях окружающей среды или развития)) применяют качественные способы (например, гистологическое окрашивание GUS ( $\beta$ -глюкуронидазой)). Количественные способы (например, флуориметрические анализы GUS) также количественно определяют уровень активности по сравнению с контролями. Подходящие контроли включают, без ограничения, растения, трансформированные пустыми векторами (отрицательные контроли), или трансформированные конструкциями, содержащими другие промоторы, такие как промотор CER6 *Arabidopsis*, который является активным в эпидермисе и трихомах *Nicotiana tabacum*.

Для исследования или количественного определения активности промотора или фрагмента CANON согласно настоящему техническому решению последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33, или биологически активные фраг-

менты указанной последовательности можно функционально связать с известной последовательностью нуклеиновой кислоты (например, репортерным геном, таким как *gusA*, или любым геном, кодирующим конкретный белок), и можно применять для трансформации клетки растения с помощью известных способов. Активность промотора или фрагмента CANON можно, например, проанализировать (и необязательно количественно определить) путем обнаружения уровня РНК-транскриптов последовательности нуклеиновой кислоты в направлении 5'-3' в клетках трихом методом количественной ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) или другими методами на основе ПЦР. В качестве альтернативы репортерный белок или активность репортерного белка можно проанализировать и количественно определить с помощью, например, флуориметрического анализа GUS, если репортерный ген представляет собой ген *gus*.

В некоторых вариантах реализации промоторы согласно настоящему техническому решению можно применять для управления экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, в клетках трихом. Гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать любой созданный человеком рекомбинантный или встречающийся в природе белок, такой как фермент пути биосинтеза каннабиноидов оливола-синтаза (OLS), циклаза оливоловой кислоты (OAC), ароматическая пренилтрансфераза (PT), гексаноил-КоА-синтаза (AAE1-1), CBDA-синтаза, THCA-синтаза или CBCA-синтаза, представленные в SEQ ID NO: 4, 7, 10, 15, 20, 27 и 30 соответственно.

#### D. Растения- и клетки-хозяева и регенерация растений.

Конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению можно применять для трансформации клетки-хозяина, такой как клетка растения. В некоторых вариантах реализации конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению применяют для трансформации по меньшей мере части клеток растения. Данные векторы экспрессии можно временно ввести в клетки растения-хозяина или стабильно встроить в геномы клеток растения-хозяина для получения трансгенных растений с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники.

Способы введения конструкций нуклеиновой кислоты в клетку или растение хорошо известны в данной области техники. Подходящие способы введения конструкций нуклеиновой кислоты (например, векторов экспрессии) в трихомы растений для получения трансгенных растений включают, без ограничения, опосредованную агробактериями (*Agrobacterium*) трансформацию, доставку методом генной пушки, микроинъекцию, электропорацию, трансформацию протопластов с помощью полиэтиленгликоля и опосредованную липосомами трансформацию. В способах трансформации двудольных растений преимущественно применяют *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium rhizogenes* можно применять для получения трансгенных культур "бородатых корней" растений, включая коноплю и табак, как описано, например, в публикации Guillon et al., *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:341-6 (2006). "Бородатые корни табака" обозначают корни табака, которые содержат Т-ДНК из R1-плазмиды *Agrobacterium rhizogenes*, встроенную в геном, и растут в культуре без добавления ауксина и других фитогормонов.

Кроме того, растения можно трансформировать путем трансформации на основе *Rhizobium*, *Sinorhizobium* или *Mesorhizobium* (Broothaerts et al., *Nature* 433: 629-633 (2005)).

После трансформации клеток растения или растения те клетки растения или те растения, в которые была встроена желаемая ДНК, можно отобрать с помощью таких способов, как устойчивость к антибиотикам, устойчивость к гербицидам, толерантность к аналогам аминокислот или с применением фенотипических маркеров.

Трансгенные растения можно применять в общепринятой схеме скрещивания растений, такой как скрещивание, самоопыление или обратное скрещивание, для получения дополнительных трансгенных растений, содержащих трансген.

Подходящие клетки-хозяева включают клетки растений. Любое растение может являться подходящим хозяином, включая однодольные растения или двудольные растения, такие как, например, маис/кукуруза (виды *Zea*, например, *Z. mays*, *Z. diploperennis* (чапуле), *Zea luxurians* (гватемальская теосинте), *Zea mays* подвид *huehuetenangensis* (теосинте Сан-Антонио Гуиста), *Z. mays* подвид *mexicana* (мексиканская теосинте), *Z. mays* подвид *parviglumis* (бальзовая теосинте), *Z. Perennis* (теосинте многолетняя) и *Z. tamosa*, пшеница (виды *Triticum*), ячмень (например, *Hordeum vulgare*), овес (например, *Avena sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*), рожь (*Secale cereale*), соя (*Glycine* spp, например, *G. max*), хлопок (виды *Gossypium*, например, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (например, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa* и т.д.), подсолнечник (*Helianthus annuus*), табак (виды *Nicotiana*), люцерна (*Medicago sativa*), рис (виды *Oryza*, например, группа сортов *O. sativa indica* или *japonica*), кормовые травы, африканское просо (виды *Pennisetum*, например, *P. glaucum*), виды деревьев, виды овощей, такие как *Lycopersicon* ssp (недавно вновь классифицированный как принадлежащий к роду *Solanum*), например, томат (*L. esculentum*, syn. *Solanum lycopersicum*) такой как, например, томат "черри", var. *cerasiforme* или смородиновидный томат, var. *pimpinellifolium*) или томатное дерево (*S. betaceum*, syn. *Cyphomandra betaceae*), картофель (*Solanum tuberosum*) и другие виды *Solanum*, такие как баклажан (*Solanum melongena*), персико (*S. muricatum*), кокона (*S. sessiliflorum*) и наранхилла (*S. quitoense*); перцы (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*), горох (например, *Pisum sativum*), фасоль (например, виды *Phaseolus*), морковь (*Daucus carota*), виды *Lactuca* (такие как *Lactuca sativa*, *Lactuca indica*, *Lactuca perennis*), огурец (*Cucumis sativus*), дыня (*Cucumis*

melo), кабачок (*Cucurbita pepo*), тыква (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita mixta*), тыква обыкновенная (*Cucurbita pepo*), арбуз (*Citrullus lanatus* syn. *Citrullus vulgaris*), виды сочных плодов (виноград, персики, сливы, клубника, манго, дыня), декоративные виды (например, роза, *Petunia*, *Chrysanthemum*, лилия, тюльпан, виды *Gerbera*), древесные деревья (например, виды *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), волокнистые виды, например, лен (*Linum usitatissimum*) и посевная конопля (*Cannabis sativa*). В некоторых вариантах реализации растение представляет собой *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации растение представляет собой *Nicotiana tabacum*.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящее изобретение предусматривает применение трихома-специфичных промоторов и/или фрагментов CANON, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, представленные в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активные фрагменты указанных последовательностей, для генетического регулирования синтеза каннабиноидов (например, THC, CBD, CBC) или других молекул в растениях-хозяевах, таких как *C. sativa*, растения семейства Solanaceae, такие как *N. tabacum*, и другие семейства растений и виды, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

Настоящее изобретение также предусматривает системы культур клеток (например, культуры клеток растений, культуры клеток бактерий или грибов, культуры клеток человека или млекопитающих, культуры клеток насекомых), содержащие генетически сконструированные клетки, трансформированные молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации предложена культура клеток, которая содержит клетки, содержащие промотор или фрагмент CANON согласно настоящему изобретению.

Для определения того, демонстрирует ли клетка растения изменения в экспрессии гена, можно применять различные анализы, например нозерн-блоттинг или количественную ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). Из трансформированной клетки общепринятыми способами можно регенерировать целые трансгенные растения. Такие трансгенные растения можно размножить или провести их самоопыление для получения гомозиготных линий. Такие растения образуют семена, содержащие гены для введенного свойства, и их можно выращивать для получения растений, которые будут образовывать выбранный фенотип.

Для усиления экспрессии и/или накопления молекулы, представляющей интерес, в клетках трихом и/или для способствования очистке молекулы из клеток трихом можно применять способы понижающей регуляции по меньшей мере одной молекулы, эндогенной для трихом растений. Трихомы, как известно, содержат большое количество компонентов и метаболитов, которые препятствуют продукции других молекул в клетках трихом. Данные соединения и метаболиты включают, например, протеазы, полифенолоксидазу (РРО), полифенолы, кетоны, терпеноиды и алкалоиды. Была описана понижающая регуляция таких компонентов трихом. См., например, патент США № 7498428.

#### Примеры

Следующие примеры предложены исключительно в качестве иллюстрации, а не ограничения. Специалисты в данной области техники с легкостью определят множество некритичных параметров, которые можно изменить или модифицировать для получения, по существу, таких же или подобных результатов. Примеры ни в коем случае не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения, который определен в прилагаемой формуле изобретения.

Пример 1. Идентификация трихома-специфичных промоторов.

Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора оливетол-синтазы (OLS), (ii) промотора OLS1 и (iii) промотора OLS2 представлены в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и открытая рамка считывания (ОРС) OLS представлена в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора циклазы оливетоловой кислоты (ОАС) представлена в SEQ ID NO: 5, последовательность нуклеиновой кислоты промотора ОАС1 представлена в SEQ ID NO: 6, и ОРС ОАС представлена в SEQ ID NO: 7. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора ароматической пренилтрансферазы (РТ) представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность нуклеиновой кислоты промотора РТ1 представлена в SEQ ID NO: 9, и ОРС РТ представлена в SEQ ID NO: 10. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE1-1), (ii) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE1-1'); (iii) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE3) и (iv) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE12) представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14 соответственно, и ОРС гексаноил-КоА (AAE-1) представлена в SEQ ID NO: 15. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора CBDA-синтазы (CBDAS), (ii) промотора CBDAS-синтазы 1 (CBDAS1), (iii) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800 и (iv) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800' представлены в SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19 соответственно, и последовательность нуклеиновой кислоты ОРС CBDA-синтазы (CBDAS) представлена в SEQ ID NO: 20. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603, (ii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603', (iii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320, (iv) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320', (v) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330 и (vi) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330' представлены в SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 и 26 соответственно, и ОРС THCAS представлена в SEQ ID NO: 27. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы (CBCAS) 3498 представлена в SEQ ID NO: 28, последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы

(CBCAS) 3498' представлена в SEQ ID NO: 29, и OPC CBCA-синтазы (CBCAS) представлена в SEQ ID NO: 30.

Трихома-специфичные промоторы были идентифицированы путем проведения поиска для предварительной версии геномной последовательности *Cannabis sativa* с применением механизма поиска BLAT с кодирующими областями генов биосинтетического фермента в пути биосинтеза каннабиноидов. Для каждого совпадения геномной последовательности запускали программу прогнозирования гена (с применением программы FGENESH), чтобы установить первый ATG. Затем устанавливали сайт начала транскрипции путем сравнения геномной последовательности с наиболее длинными доступными последовательностями кДНК в базе данных NCBI NR. Как множественные выравнивания последовательности (для генов CBDA- и THCA-синтазы), так и введение запросов в базе данных PLACE позволили установить области ТАТА-боксов. После установления стартового кодона, сайта начала транскрипции и ТАТА-боксов было подтверждено расположение и последовательность промоторов.

Пример 2. Трихома-специфичные промоторы для направления продукции каннабиноидов в *Nicotiana tabacum*.

Каннабиноиды синтезируются и накапливаются в трихомах конопли. Оливетол-синтаза (OLS), циклаза оливетоловой кислоты (OAC), ароматическая пренилтрансфераза (PT), гексаноил-КоА-синтаза (AAE1-1), CBDA-синтаза, CBCA-синтаза и THCA-синтаза являются ферментами пути биосинтеза каннабиноидов. Соответственно, ожидают, что промоторы для каждого из данных ферментов будут направлять экспрессию кодируемых нуклеиновых кислот в клетках трихом. В данном примере продемонстрировано применение трихома-специфичных промоторов согласно настоящему техническому решению или биологически активных фрагментов указанных промоторов для экспрессии биосинтетических ферментов каннабиноидов в растениях и клетках растений, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

Способы.

Конструкции вектора. Последовательности промотора (SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33) помещали перед маркером GUS-A в вектор, приспособленный для экспрессии в клетке *Nicotiana tabacum*, такой как Ti-плазмидный вектор. Конструкции встраивали в *Agrobacterium tumefaciens* и использовали для трансформации *N. tabacum* в соответствии со способами, известными в данной области техники. Конструкции трансформировали и регенерировали при селекции с канамицином, и первичные регенеранты (T<sub>0</sub>) выращивали для получения семян.

В качестве контроля табак трансформировали конструкцией, содержащей промотор табака NtCPS2. Было показано, что промотор NtCPS2 является в высокой степени эффективным для направления трихома-специфичной экспрессии в *N. tabacum* (Sallaud et al., *The Plant Journal* 72:1-17 (2012)).

Анализ экспрессии. Количественные и качественные анализы активности β-глюкуронидазы (GUS) проводили на растениях T<sub>1</sub>. Качественный анализ активности промотора проводили с применением гистологических анализов GUS и с помощью визуализации зеленого флуоресцентного белка (GFP) с использованием флуоресцентного микроскопа. В случае анализов GUS различные части растения инкубировали в течение ночи при температуре 37°C в присутствии атмосферного кислорода с субстратом Xglue (соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронидциклогексиламины) в фосфатном буфере (1 мг/мл, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мкМ, pH 7,2, 0,2% Triton X-100). Образцы обесцвечивали повторяющимися промывками этанолом. В качестве отрицательных контролей использовали нетрансгенные растения. Предполагают, что трихомы трансгенных растений с OLS:GUS, OAC:GUS, PT:GUS, AAE1-1:GUS, CBDAS:GUS, CBCAS:GUS и THCAS:GUS демонстрируют ярко-синее окрашивание, тогда как ткани данных трансгенных растений, отличные от трихом, и трихомы нетрансгенных контрольных растений не будут окрашены.

Количественный анализ активности промотора проводили с применением флуориметрического анализа GUS. Образцы суммарного белка получали из материала молодого листа; образцы получали из объединенных частей листьев. Свежий материал листа измельчали в ФБР (фосфатном буферном растворе) с применением металлических частиц с последующим центрифугированием и сбором супернатанта.

Результаты.

Растения и клетки растений, которые подвергали генно-инженерным манипуляциям с помощью векторов экспрессии, содержащих промоторы согласно настоящему изобретению или биологически активные фрагменты указанных промоторов, демонстрировали трихома-специфичную транскрипционную активность. Как представлено на фиг. 2B, трихомы трансгенного растения, трансформированного CBDAS 20800:GUS, продемонстрировали ярко-синее окрашивание, тогда как ткани, отличные от трихом растения, не были окрашены. Трихома-специфичная экспрессия для других промоторов в пути биосинтеза каннабиноидов является качественно подобной (фиг. 3). Результаты, представленные на фиг. 3, демонстрируют трихома-специфичную экспрессию промоторов из полного пути биосинтеза каннабиноидов в трихомах табака. Соответственно, данные результаты демонстрируют, что промоторы из полного пути биосинтеза каннабиноидов, описанные в настоящем документе, являются подходящими для предпочтительного направления экспрессии функционально связанного гена в ткани трихом по сравнению с экс-

прессией в корне, листе, стебле или других тканях растения. Данная трихома-специфичная экспрессия является важнейшим инструментом для регулирования биосинтеза трихома-специфичных биохимических соединений, таких как цитотоксические каннабиноиды. Кроме того, данные промоторы являются важными для стратегий, направленных на применение трихом табака или конопли в качестве биологических фабрик для контролируемой продукции конкретных биохимических соединений.

Пример 3. Идентификация фрагментов "Cannabinoid On" ("CANON") для направления трихома-специфичной экспрессии в *Nicotiana tabacum*.

Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента "Cannabinoid On" ("CANON") представлена в SEQ ID NO: 31. Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента CANON вместе с предполагаемым ТАТА-боксом, 5'-UTR и стартовым кодоном представлена в SEQ ID NO: 32. Последовательность нуклеиновой кислоты синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON представлена в SEQ ID NO: 33. Консенсусный фрагмент CANON получен из трихома-специфичных промоторов из THCA-синтазы 19603, 1330, 50320, CBDA-синтазы 3498 и CBDA-синтазы 20800.

Способы.

Фрагменты CANON были идентифицированы путем проведения поиска для геномной последовательности Purple Kush с применением механизма поиска BLAT. Поиск BLAT для геномной последовательности Purple Kush с применением гена THCA-синтазы позволил получить следующие результаты.

Результаты поиска в BLAT.

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser_details</a>	THCA	979	1	979	979	100.0%	scaffold19603	+	6901	7879	979
<a href="#">browser_details</a>	THCA	499	257	979	979	89.4%	scaffold50320	-	8585	9462	878
<a href="#">browser_details</a>	THCA	466	257	979	979	89.1%	scaffold1330	-	2572	3369	798
<a href="#">browser_details</a>	THCA	332	593	979	979	94.2%	scaffold3498	+	9881	10270	390
<a href="#">browser_details</a>	THCA	275	590	979	979	85.6%	scaffold6274	+	24419	24803	385
<a href="#">browser_details</a>	THCA	271	590	979	979	86.5%	scaffold39155	-	4079	4464	386
<a href="#">browser_details</a>	THCA	251	1	258	979	97.7%	scaffold17297	+	9858	10113	256
<a href="#">browser_details</a>	THCA	222	590	979	979	86.0%	scaffold46100	-	1795	2180	386
<a href="#">browser_details</a>	THCA	206	3	271	979	89.0%	scaffold33063	-	10241	10479	239
<a href="#">browser_details</a>	THCA	196	578	979	979	91.2%	scaffold20800	-	4646	5042	397
<a href="#">browser_details</a>	THCA	167	69	267	979	94.7%	scaffold12036	+	133813	134227	415
<a href="#">browser_details</a>	THCA	156	89	258	979	96.5%	scaffold17775	-	18105	18274	170
<a href="#">browser_details</a>	THCA	142	260	514	979	87.5%	scaffold59317	+	863	1300	438
<a href="#">browser_details</a>	THCA	136	120	268	979	96.6%	scaffold12751	-	46584	46732	149
<a href="#">browser_details</a>	THCA	128	120	257	979	97.1%	scaffold87266	-	12096	12233	139
<a href="#">browser_details</a>	THCA	128	120	257	979	97.1%	scaffold23985	+	18853	18990	139
<a href="#">browser_details</a>	THCA	127	120	258	979	96.4%	scaffold14882	+	59722	59860	139
<a href="#">browser_details</a>	THCA	123	98	269	979	85.9%	scaffold4283	-	23256	23416	161

Выделенные промоторы были выбраны для последующего анализа; проводили сравнение последовательностей пяти промоторов. Пять промоторов продемонстрировали высокую степень подобия последовательности от сайта начала трансляции до приблизительно 160 пар оснований в направлении 3'-5' от предполагаемого ТАТА-бокса, но невысокую степень подобия последовательности в направлении 3'-5' от ТАТА-бокса.

Из пяти промоторов получали консенсусную последовательность, и последовательность использовали для исследования трихома-специфичной активности промотора в трихомах табака с применением синтетического промотора, названного "синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON". Синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON содержит четыре копии консенсусного фрагмента CANON, который не обнаружен в природе, перед одной копией минимального промотора (ТАТА-бокс, сайт начала транскрипции и первый АТГ). *N. tabacum* трансформировали синтетическим промотором из 4-кратного фрагмента CANON, помещенным перед маркером GUS-A, как описано в примере 2, и проводили анализ экспрессии GUS.

Результаты.

Как представлено на фиг. 4В, синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON направляет экспрессию в трихомах. Соответственно, данные результаты демонстрируют, что фрагмент CANON является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в промоторе с приобретением функции и вследствие этого отвечает за трихома-специфичную экспрессию большого числа генов биосинтетического фермента каннабиноидов, включая THCA-, CBDA- и CBGA-синтазы.

Эквиваленты.

Настоящее изобретение не следует считать ограниченным рамками конкретных вариантов реализации, описанных в настоящей заявке, которые используются в качестве единичных иллюстраций отдельных аспектов настоящего изобретения. Можно осуществить множество модификаций и вариаций настоящего технического решения в пределах его сущности и объема, как будет понятно специалистам в данной области техники. Специалистам в данной области техники из приведенных выше описаний будут понятны функционально эквивалентные способы и аппараты в пределах объема настоящего изобретения в дополнение к таковым, перечисленным в настоящем документе. Такие модификации и вариации предназначены для включения в пределы объема прилагаемой формулы изобретения. Настоящее изобретение ограничено исключительно рамками прилагаемой формулы изобретения наряду с полным объемом эквивалентов, на которые имеет право данная формула изобретения. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами, реактивами, соединениями, композициями или биоло-

гическими системами, которые, разумеется, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

Помимо этого, когда свойства или аспекты настоящего раскрытия описаны в понятиях групп Маркуша, специалисты в данной области техники понимают, что раскрытие посредством этого также описано в понятиях любого индивидуального члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Как понимает специалист в данной области техники, для любой и всех целей, в особенности применительно к обеспечению письменного описания, все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон можно с легкостью признать в достаточной степени описывающим и позволяющим разделить тот же диапазон по меньшей мере на равные половины, третьи, четвертые, пятые, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем документе, можно с легкостью разделить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Как также понимает специалист в данной области техники, все выражения, такие как "до", "по меньшей мере", "более", "менее" и т.п., включают указанное число и обозначают диапазоны, которые могут быть впоследствии разбиты на поддиапазоны, как обсуждается выше. Наконец, как понимает специалист в данной области техники, диапазон включает каждое индивидуальное число. Таким образом, например, группа, содержащая 1-3 клетки, обозначает группы, содержащие 1, 2 или 3 клетки. Аналогично группа, содержащая 1-5 клеток, обозначает группы, содержащие 1, 2, 3, 4 или 5 клеток, и т.д.

Все общедоступные документы, ссылки на которые или цитаты из которых содержатся в настоящем документе, такие как патенты, заявки на патент, предварительные заявки и публикации, включая учетные номера базы данных GenBank, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, включая все чертежи и таблицы, в той мере, в какой они не противоречат явным идеям настоящего описания.

Другие варианты реализации изложены в следующей формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31-33; и

(b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

2. Синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

3. Вектор экспрессии, содержащий молекулу ДНК по п.1 или 2, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

4. Генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.3.

5. Генетически сконструированная клетка-хозяин по п.4, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку *Cannabis sativa* или клетку *Nicotiana tabacum*.

6. Генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК по п.1 или 2.

7. Сконструированное растение по п.6, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой растение *N. tabacum* или растение *C. sativa*.

8. Семена сконструированного растения по любому из пп.6, 7, отличающиеся тем, что указанные семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

9. Генетически сконструированное растение, содержащее химерный ген, встроенный в геном, причем указанный химерный ген содержит трихома-специфичный промотор, функционально связанный с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, причем указанный промотор выбран из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33; и

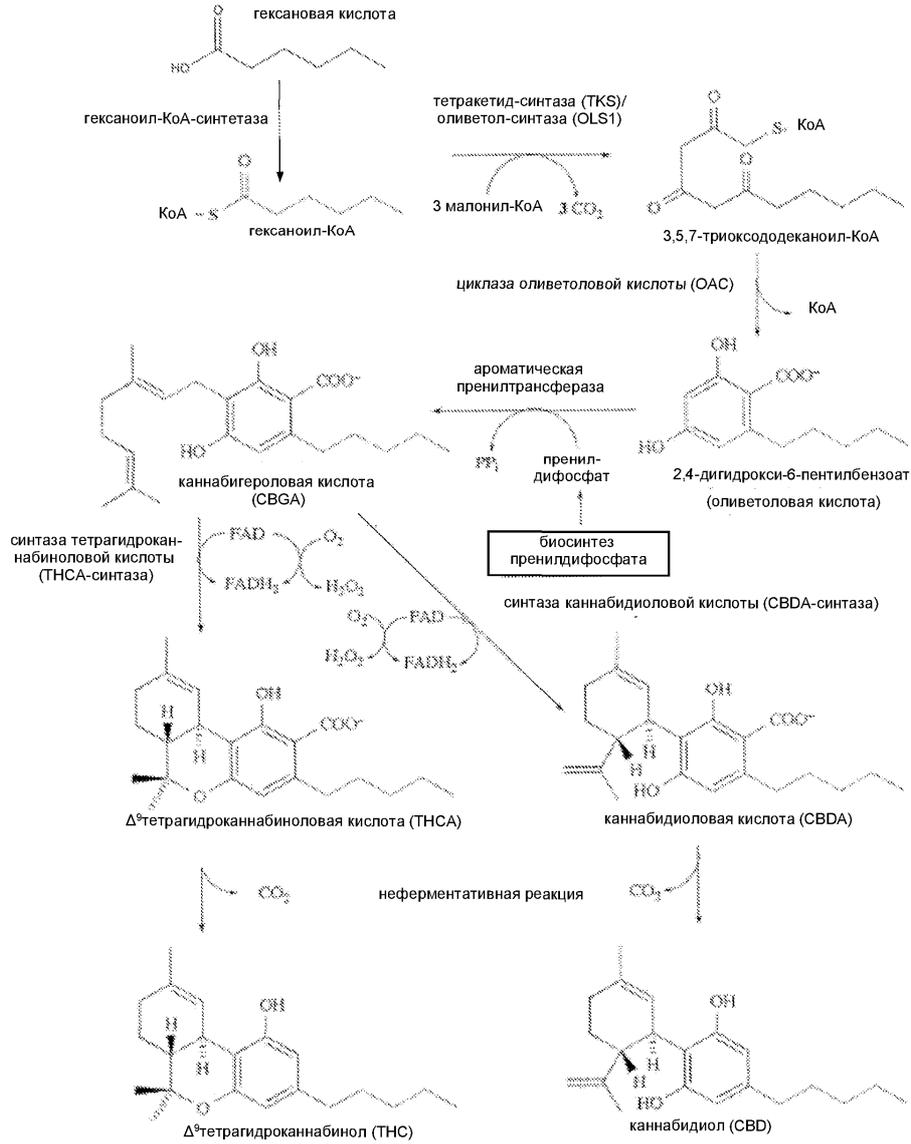
(b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железу трихомы растения.

10. Генетически сконструированное растение по п.9, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой растение *N. tabacum* или растение *C. sativa*.

11. Способ экспрессии полипептида в трихомах растений, включающий:

(a) введение в клетку-хозяин вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из

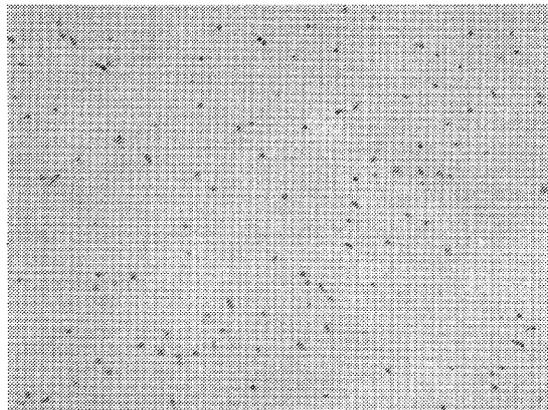
- (i) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31-33; и
- (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения;
- причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид; и
- (b) выращивание указанного растения в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного полипептида.
12. Способ увеличения уровня каннабиноида в трихоме растения-хозяина, включающий:
- (a) введение в клетку-хозяин вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из
- (i) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31-33; и
- (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения;
- причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент пути биосинтеза каннабиноидов; и
- (b) выращивание указанного растения в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного фермента пути биосинтеза каннабиноидов;
- причем экспрессия указанного фермента пути биосинтеза каннабиноидов приводит к получению растения, которое характеризуется повышенным содержанием каннабиноида по сравнению с контрольным растением, выращенным в подобных условиях.
13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанный фермент пути биосинтеза каннабиноидов представляет собой синтазу каннабидиоловой кислоты (CBDA), синтазу каннабихроменовой кислоты (CBCA) или синтазу  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA).
14. Способ по п.13, дополнительно включающий обеспечение растения каннабигероловой кислотой (CBGA).
15. Генетически сконструированное растение, полученное на стадии (b) способа по п.12, отличающееся тем, что указанное растение характеризуется повышенным содержанием  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола (THC), каннабихромена (CBC) и/или каннабидиола (CBD) по сравнению с контрольным растением.
16. Генетически сконструированная клетка растения, содержащая химерный ген, встроенный в геном, причем указанный химерный ген содержит трихома-специфичный промотор, функционально связанный с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, и причем указанный промотор выбран из группы, состоящей из
- (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33; и
- (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.
17. Генетически сконструированная клетка растения по п.16, отличающаяся тем, что указанная клетка растения представляет собой клетку растения *N. tabacum* или клетку растения *C. sativa*.



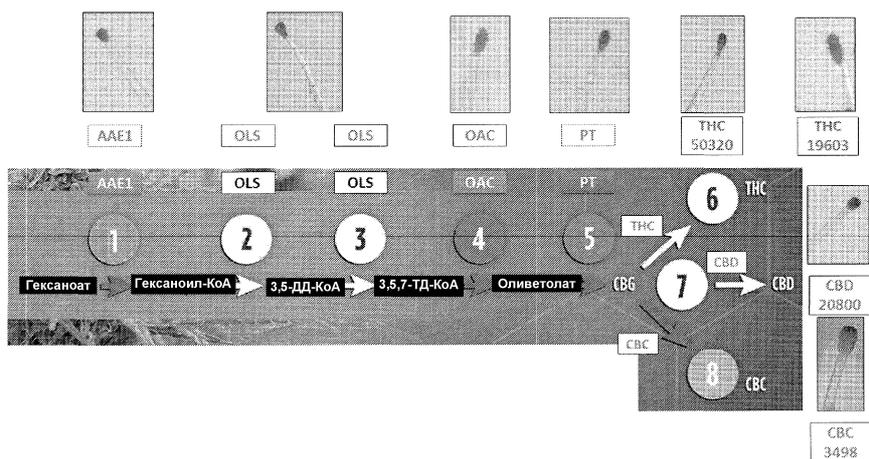
Фиг. 1



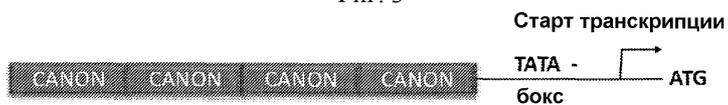
Фиг. 2А



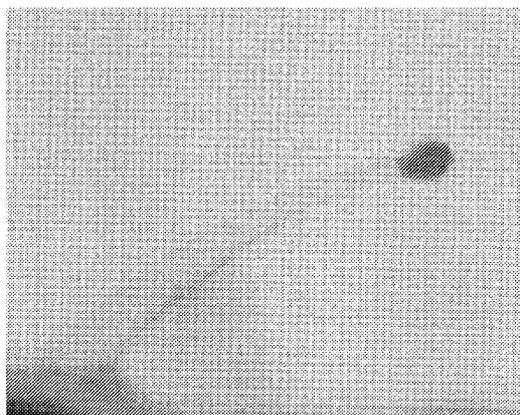
Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В