

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041949**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.19

(21) Номер заявки
201992362

(22) Дата подачи заявки
2018.04.03

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(54) НАПРАВЛЕННЫЕ МОСКИТОЦИДНЫЕ ТОКСИНЫ(31) **62/481,199**(32) **2017.04.04**(33) **US**(43) **2020.02.28**(86) **PCT/US2018/025907**(87) **WO 2018/187342 2018.10.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЭЙЛОР ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
**Кири Кристофер Мишель, Пруэтт
Грейс (US)**

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

(56) **WO-A2-2010077672**
US-A1-2013097729
WO-A1-2012131302
US-A1-2008300210

Marisa Pinson: "ABSTRACT Evaluating and Isolating Promoters in Impatiens walleriana: Towards the Development of Mosquitocidal Nectar", 10 August 2016 (2016-08-10), XP055481599, Retrieved from the Internet: URL: <https://baylor-ir.tdl.org/baylor-ir/bitstream/handle/2104/9759/Pinson%20Honors%20Thesis%20BEARdocs.pdf?sequence=3&isAllowed=y> [retrieved on 2018-06-06], abstract; pages 3-5, 8-10, 13, 14, 19, 20, 25-31; Figure 2

KIM T.G. ET AL.: "Cholera toxin B subunit-domain III of dengue virus envelope glycoprotein E fusion protein production in transgenic plants", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 74, no. 2, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 236-241, XP027394796, ISSN: 1046-5928, DOI:10.1016/J.PEP.2010.07.013 [retrieved on 2010-08-04], abstract; page 236, 237; Figure 1

(57) Инсектицидные токсины, описываемые в настоящем документе, представляют собой слитые токсические пептиды, получаемые из направленного домена, слитого с токсическим доменом. Направленный пептид обеспечивает специфическую ассоциацию для комаров, обуславливая связывание слитого токсического пептида со структурами у комаров способом, приводящим к инсектицидной активности. Трансгенные растения, описываемые в настоящем документе, являются москитоцидными вследствие экспрессии в нектар инсектицидного токсического белка, который содержит направленный пептид, обеспечивающий специфичность против комаров. Эти трансгенные растения служат примером безопасности, так как они не являются сельскохозяйственными культурами и специфичны для одного вида комаров.

B1**041949****041949****B1**

Предшествующий уровень техники

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 62/481199, озаглавленной "Targeted Mosquitocidal Toxins", зарегистрированной 4 апреля 2017 г., полное содержание которой, таким образом, включено в качестве ссылки.

Настоящее изобретение относится к направленным москитоцидным токсинам и к растениям, сконструированным для продукции москитоцидных токсинов для контроля популяций комаров.

Комары являются одним из наиболее повсеместно нелюбимых вредителей. Помимо их общего неприятия, они являются носителями ряда смертельных и повреждающих заболеваний. Порождаемые комарами заболевания ежегодно приводят к миллионам смертей, особенно в развивающихся странах. Разработка вакцин имела успех только для определенной части вирусных заболеваний. Эти трудности усугубляются образованием новых патогенных организмов каждые десять лет, таких как современные заболевания Зика и Чикунгунья.

Мероприятия по контролю за популяциями комаров включают местные меры с целью удаления стоячей воды, а также генерализованное и широкомасштабное распыление инсектицидов. Эти усилия не продемонстрировали большого успеха, а в случае распыления инсектицидов, имели отрицательное влияние на не являющиеся мишенью виды. Программы с применением пестицидов являлись основой борьбы с комарами в США, но применение пестицидов может вызывать экологические последствия, что можно было наблюдать в случае массового уничтожения медоносных пчел в 2016 году в Южной Каролине после обработки пестицидами в ответ на заболевание Зика. В ограниченных ситуациях эффективны репелленты от комаров, но для повседневной жизни, особенно для семей, дисциплина ежедневного применения репеллента может нарушаться. Даже при современных мерах по борьбе с комарами многие горожане в США просто остаются летом дома, чтобы избежать риска передачи заболевания, а также надоедливости комаров.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к направленным инсектицидным белкам, которые являются токсичными для комаров, но не для не являющихся мишенью видов. Настоящее изобретение также относится к растениям, сконструированным для продукции этих токсинов. В конкретных вариантах осуществления эти трансгенные растения экспрессируют инсектицидный токсичный белок, который содержит направленный пептид, обеспечивающий специфичность против комаров. Инсектицидный токсин можно продуцировать в нектаре, производимом растениями. Эти растения являются экологически щадящим, экономически эффективным и долговременным подходом, в котором использована критически важная потребность у популяций комаров в питании нектаром.

Популяции комаров критически зависят от нектара в качестве источника пищи. Самцы используют нектар и другие источники сахара в качестве своего единственного источника питания, в то время как самки зависят от него, чтобы получать энергию для своих полетов в поисках крови, для подготовки к зимовке и других целей. Используя этот факт, эффективной мерой борьбы с комарами оказались сахарные приманки, с добавленными пестицидами. Однако более предпочтительным было бы полное исключение использования пестицидов. Биологически безопасную стратегию борьбы с комарами могли бы обеспечить приемлемые и эффективные механизмы доставки москитоцидного пептида.

Токсические пептиды, направленные на конкретные организмы, уже были получены. С использованием направленных пептидов проводили изменение специфичности противомикробных пептидов и получали слитые белки с высоким выходом в *E. coli*. Получали химически синтезированные слитые пептиды, специфически токсичные для *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus mutans*. Кроме того, показано, что трансгенные растения, экспрессирующие направленные слитые пептиды, специфически устойчивы к грибку корневой гнили *Fusarium* и тлям.

Настоящее изобретение относится к направленному слитому пептиду, содержащему направленный пептид, специфичный для комаров, и токсический пептид, которые слиты друг с другом. Направленный пептид обеспечивает захват или подобное связывание, что индуцирует токсичность токсина только у комаров. Пока слитый пептид не будет захвачен или связан таким способом, у токсического пептида будет отсутствовать токсичность. Таким образом, направленность пептида на комаров приводит к получению токсина, который не действует против не являющихся комарами насекомых. Направленный слитый пептид можно экспрессировать в любом подходящем организме, включая дрожжи или *E. coli*, а затем экстрагировать, выделять или очищать для применения в качестве москитоцидного токсина.

В определенных вариантах осуществления сконструировано растение, продуцирующее направленный слитый пептид так, чтобы обеспечивать всасывание, потребление пептида комаром, воздействие на него или иное поглощение пептида комаром. В определенных вариантах осуществления конструируют продуцирующее нектар растение с экспрессией направленного слитого пептида в нектаре. Нектар является критически важным компонентом жизненного цикла комаров и является очень привлекательным для них. У самцов комаров от нектара или поставляемого источника сахара зависит жизнеспособность, тогда как самкам комаров нектар необходим для обеспечения энергией их полетов в поисках крови. Не продуцирующие нектар растения также можно подвергать инженерии так, чтобы они экспрессировали направленный слитый пептид, при условии, что он экспрессирован способом, обеспечивающим потреб-

ление или поглощение токсичного пептида комарами.

Настоящее изобретение также относится к трансгенным mosquitoцидным растениям, продуцирующим направленный слитый пептид. В определенных предпочтительных вариантах осуществления растения являются продуцирующими нектар растениями, но они могут являться любыми подходящими растениями, включая деревья и кустарники. Предпочтительные продуцирующие нектар растения, которые можно конструировать в качестве трансгенных mosquitoцидных растений, включают обычные садовые растения вида недотрога, растения, которые растут без необходимости в уходе везде во влажных тропиках, но также являющиеся наиболее продаваемыми коммерчески растениями мира. Исследования показали, что недотроги (в частности, *Impatiens walleriana*) являются превосходящими в отношении привлекательности для комаров, выхода белка в нектаре и способности к генетической трансформации. В предпочтительных вариантах осуществления растение вида недотрога подвергают инженерии для экспрессии токсина исключительно в нектаре, который нетоксичен для медоносных пчел, но эффективно борется с комарами в садовых испытаниях. Эти трансгенные растения служат в качестве примера безопасности, так как они являются несельскохозяйственными культурами, специфичны для одного вида вредителей и из можно конструировать так, чтобы у них отсутствовала способность распространять токсический трансген в окружающей экосистеме.

В предпочтительных вариантах осуществления для экспрессии направленного токсического пептида для выделения и очистки или для трансформации растения в трансгенное mosquitoцидное растение используют экзогенную генетическую конструкцию. Конструкция предпочтительно включает различные характеристики. Используют растением-специфические промоторы, такие как промоторы нектара растений вида недотрога. С конструкции экспрессируют инсектицидный токсический пептид. Также экспрессируют направленный пептид, формирующий слитый пептид с токсическим пептидом, предпочтительно для поражения комаров посредством специфического связывания, такого как связывания с эпителием кишечника. Направленные токсины токсичны для комаров, но не для не являющихся мишенью видов насекомых. Эти свойства составляют mosquitoцидные характеристики токсического пептида. Mosquitoцидные продуцирующие нектар растения являются недорогими, хорошо масштабируемыми, экологически безопасными и не требуют или требуют небольшого ухода. Эта технология способна обеспечить защиту от комаров на очень больших площадях сразу в течение десятилетий.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена конструкция для экспрессии ненаправленного усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в *E. coli*.

На фиг. 2 представлена конструкция для экспрессии в *E. coli* направленного к *Aedes* EGFP.

На фиг. 3 представлены результаты анализа флуоресценции у комаров *Aedes aegypti* с использованием направленного и ненаправленного EGFP.

На фиг. 4 представлена конструкция для экспрессии в *E. coli* ненаправленного инсектицидного токсина Hv1a.

На фиг. 5 представлена конструкция для экспрессии в *E. coli* направленного к *Aedes* инсектицидного токсина Hv1a.

На фиг. 6 представлено сравнение кривых выживаемости *Aedes aegypti* после перорального введения направленного и ненаправленного токсинов.

На фиг. 7 представлены результаты анализа флуоресценции у комаров *Culex quinquefasciatus* с использованием EGFP, направленного на комаров *Aedes* и ненаправленного EGFP.

На фиг. 8 представлено сравнение кривых выживаемости *Culex quinquefasciatus* после перорального введения специфичных для *Aedes* токсинов и ненаправленных токсинов.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Настоящее изобретение относится к направленным токсическим пептидам, которые являются токсичными для комаров, но не для других не являющихся мишенью видов. Настоящее изобретение также относится к mosquitoцидным растениям, которые экспрессируют экзогенные гены, кодирующие токсины, специфичные для комаров.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящая технология относится к токсинам, направленным на комаров. Токсины представляют собой токсические пептиды, состоящие из направленного домена, слитого с токсическим доменом.

Направленный пептид осуществляет специфическую ассоциацию со структурами у комаров, например обеспечивая связывание слитого токсического пептида со структурами у комаров таким образом, чтобы индуцировать токсичность. В предпочтительных вариантах осуществления направленный пептид специфически направлен к роду или виду комара. Существует три конкретных вида комаров, которые наиболее замешаны в распространение заболевания: *Aedes aegypti*, которые переносят возбудителя желтой лихорадки, лихорадки Зика, Чикунгуньи, лихорадки денге и энцефалита; *Anopheles gambiae*, которые переносят возбудителя малярии; и различные виды рода *Culex*, которые переносят вирусы лихорадки Западного Нила, энцефалита и возбудителей филяриоза. В предпочтительном варианте осуществления направленный пептид сконструирован направленным на *Aedes aegypti*. Показано, что активной структурой, которая позволяет вирусной частице денге связываться с эпидермальными клетками кишечника ко-

мара, обеспечивая успешное вхождение вируса в клетки, является домен III гликопротеина вируса лихорадки денге (Hrobowski (2005), *Virology Journal*, 2:49). В предпочтительном варианте осуществления пептид, получаемый из домена III гликопротеина вируса денге, используют для направления инсектицидных пептидов в кишечник *Aedes aegypti*. Использование этого направленного белка для направления слитого токсического пептида специфически в кишечник комара приводит к тому, что токсин является летальным для комаров, не действуя на медоносных пчел и других опылителей.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления направленный пептид обладает следующей последовательностью: MIGVEPGQLKLNWFKK (SEQ ID NO: 1).

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления направленные домены можно получать из последовательности домена III вирусов Зика или Западного Нила. В дополнение к комарам *Aedes* направленные домены можно конструировать направленными на другие виды комаров, такие как различные виды рода *Culex*. Соответствующие направленные домены работают сходным с доменом III гликопротеина вируса денге образом в том, что они позволяют вирусам, из которых их получают, специфически связываться со структурами комаров. Можно использовать любой подходящий направленный пептид при условии, что его (1) можно экспрессировать в растении; (2) он облегчает специфическое связывание с мишенью у комара в расположении, которое может индуцировать токсичность, например кишечнике, и ни с одним из не являющихся мишенью видов; и (3) способен формировать слитый пептид с выбранным пептидным токсином. Вирусы денге, Зика и Западного Нила, все, являются флавивирусами и последовательности домена III каждого из этих вирусов должны эффективно работать в качестве направленных пептидов по настоящему изобретению.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления москитовицидных растений выбран токсин, который токсичен для комаров при связывании в кишечнике. Причем необходимости использовать токсин, который отсутствует, полное отсутствие токсичности для других видов насекомых, нет. Направленный пептид, который связан с токсином, обеспечивает специфическое действие токсина только на комаров, даже если пептид из нектара недотроги поглощают другие виды. В предпочтительных вариантах осуществления токсический пептид представляет собой токсический пептид паука Hv1a. Этот токсический пептид успешно направляли на тлю.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления токсический пептид обладает следующей последовательностью: SPTCIPSGQPCYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD (SEQ ID NO: 2).

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления в слитом пептиде используют другие токсины, включая противомикробные пептиды, выявляемые в нектаре в природе, которые можно преобразовывать, обеспечивая токсичность у комаров. Можно использовать любой подходящий токсический пептид при условии, что его (1) можно экспрессировать в растении; (2) он токсичен для комаров и (3) способен формировать слитый пептид с выбранным направленным пептидом. Примеры включают токсин Cgyl1B или любой из москитовицидных токсинов Cry *Bacillus thuringiensis*. Они являются высокотоксичными особенно для личинок комаров. Другие подходящие токсины включают латероспориин (бактериоцин бактерий *Brevibacillus*) и пептид-2 дефензина *Amblyomma* (дефензин клеща *Amblyomma hebraeum*), которые являются противомикробными пептидами. Они хорошо экспрессируются в трансгенных растениях табака.

В дополнительных вариантах осуществления слитый токсический пептид состоит из подходящего направленного пептида, связанного с подходящим токсическим пептидом подходящим линкером. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления направленный пептид SEQ ID NO: 1 и токсический пептид SEQ ID NO: 2 связаны линкером с последовательностью GGSGGSGG (SEQ ID NO: 3).

Предпочтительные варианты осуществления относятся к самому слитому токсическому пептиду и к способам получения слитого токсического пептида, таким как экспрессия в *E. coli* или дрожжах с последующей экстракцией, выделением или очисткой пептида, в форму, которую можно использовать в качестве москитовицидного токсина. Слитый токсический пептид можно комбинировать с любым подходящим носителем, таким как сахар или нектароподобное вещество, с получением москитовицидного вещества, которое могут поглощать или потреблять комары. Вследствие направленной специфичности слитого токсического пептида для комаров вещество не является токсичным для не являющихся мишенью видов.

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления относятся к трансгенным москитовицидным растениям, сконструированным для экспрессии слитого токсического пептида таким образом, чтобы образовывался пептид, доступный комарам для поглощения или потребления или иным образом проходило представление пептида для поглощения комарами. В определенных предпочтительных вариантах осуществления трансгенные москитовицидные растения представляют собой продуцирующие нектар растения вследствие сильной природной потребности комаров в нектаре.

В предпочтительных вариантах осуществления москитовицидных продуцирующих нектар растений используют наиболее частые виды садовых недотрог, *Impatiens walleriana*, происходящие из Восточной Африки. Недотроги являются наиболее частыми растениями в цветниках по всему миру. Они являются недорогими, просто выращиваемыми и требующими мало заботы. Недавнее экологическое исследование продемонстрировало, что недотроги могут расти без ухода (в диком виде) везде во влажных тропиках, а также во многих влажных умеренных зонах, что близко соответствует ареалам обитания комаров-

переносчиков *Aedes* и *Anopheles*. Конкретно, адаптивный диапазон недотрог включает всю восточную часть США, большинство Латинской Америки, Юго-Восточную Азию, Китай, Индию, Европу и большую часть Африки. В безморозных ареалах они являются вечнозелеными растениями. В областях с отрицательными температурами их высаживают раз в год весной.

Кроме того, *Impatiens walleriana* высоко привлекательна для комаров, и специалисты в данной области без труда могут подвергать ее генетической инженерии. Геном *Impatiens walleriana* секвенирован. Для контроля экспрессии направленных на комаров токсических пептидов в *Impatiens walleriana* собран и используют в предпочтительных вариантах осуществления промотор (3 т.п.н. ДНК), контролирующей экспрессию наиболее высокоэкспрессированного белка нектара (аналог филопланина). Гены, соответствующие природным противомикробным пептидам и инсектицидным пептидам недотрог, можно выделять на основе секвенирования генома. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления их можно направлять на комаров с использованием генетических инсерционных кассет, содержащих минимум чужеродной ДНК, почти полностью с природной ДНК недотрог.

Трансгенные москитоцидные растения уникальным образом позиционированы, служа примером трансгенной биобезопасности. Эта технология обладает рядом свойств, которые облегчают принятие ЕРА и общественностью. Во-первых, эта технология обратима. В отличие от предложений с генным приводом (драйвом), борьбу с комарами всегда можно остановить, выкорчевав растения. В качестве примера недотроги не производят ризом или клубней. Также технология является местной и предсказуемой. Области контроля определяются местом посадки растений людьми. Кроме того, определенные предпочтительные растения, такие как недотроги, можно коммерчески получать с помощью черенков или семян. Таким образом, технология удаления генов токсинов из семян и пыльцы (для предотвращения выхода трансгенов в экосистему) не будет препятствовать коммерческому производству. Также не ожидается токсического действия на не являющихся мишенями медоносных пчел или других не являющихся мишенями насекомых. Также это представляет собой медицинское применение, а не пищевой продукт. В отличие от культур ГМО, эти растения не являются частью пищевой цепи человека. Это применение также приобретает и внедряет конечный пользователь. В отличие от пищевых продуктов, получаемых в далеко расположенных сельских хозяйствах, это решение является собственностью конечного пользователя технологии, что способствует приятию. Наконец, конкретно садовые растения являются традиционной и устоявшейся частью частной жизни. Технология по настоящему изобретению делает борьбу с комарами "частью ландшафта".

Таким образом, предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают способ получения экспрессирующих москитоцидные токсины модифицированных растений, включающих продуцирующих москитоцидный нектар растений, экспрессирующих москитоцидные токсины в нектар растений. Способ включает индукцию экспрессии экзогенной генной конструкции, кодирующей слитый токсический пептид в клетках растений так, что слитый токсический пептид фактически присутствует и врожденно экспрессирован растением. Слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, и специфически токсичен для комаров. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления растение представляет собой *Impatiens walleriana*. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления направленный на комаров пептид направлен на одного или нескольких из комаров *Aedes*, *Anopheles* или *Culex*. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления направленный на комаров пептид направлен на комаров *Aedes aegypti*, например связываясь с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления токсический пептид является пептидом с токсичностью для комаров и предпочтительно может представлять собой токсический пептид паука Hv1a. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления у слитого токсического пептида отсутствует токсичность в отношении других организмов.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения используется экзогенная генная конструкция, которая содержит промотор, специфичный для растения, ген, кодирующий направленный на комаров пептид, и ген, кодирующий токсический пептид. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления экспрессию экзогенной генной конструкции в растении индуцируют, трансформируя по меньшей мере одну продуцирующую нектар клетку растения с экзогенной генной конструкцией с получением модифицированного растения, экспрессирующего слитый токсический пептид в нектаре этого растения.

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления относятся к получению модифицированных растений, которые не экспрессируют токсин в тканях, отличных от нектара. В этих предпочтительных вариантах осуществления в модифицированном растении также индуцирована экспрессия кассеты терминатора, и кассета терминатора вырезает из нуклеиновой кислоты экзогенную генную конструкцию, найденную в клетках растения, отличных от клеток, продуцирующих нектар, например в клетках семян, пыльцы, корней и листьев. Таким образом, модифицированное растение экспрессирует слитый токсический пептид в своем нектаре и не может экспрессировать слитый токсический пептид в производящих нектар тканях.

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают

модифицированное москитоцидное растение, где модифицированное растение экспрессирует экзогенную генную конструкцию, кодирующую слитый токсический пептид в клетках растения таким образом, что слитый токсический пептид становится доступным для потребления комарами, экспозиции комарам или общего поглощения, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, и где слитый токсический пептид токсичен для комаров. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления растение представляет собой продуцирующее нектар растение, а слитый токсический пептид экспрессирован в нектаре растения. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления модифицированное растение представляет собой *Impatiens walleriana*. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления модифицированное растение экспрессирует направленный на комаров пептид в качестве части слитого токсического пептида, который направлен на комаров *Aedes*, *Anopheles* или *Culex*, или предпочтительно пептид, направленный на комаров *Aedes aegypti*. Направленный на комаров пептид предпочтительно может связываться с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*. Как правило, в предпочтительных вариантах осуществления токсический пептид представляет собой пептид, токсичный для комаров, и предпочтительно токсический пептид представляет собой токсический пептид паука Hv1a. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления у слитого токсического пептида, экспрессируемого модифицированным москитоцидным растением, отсутствует токсичность для других организмов.

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления включают семена модифицированного москитоцидного растения.

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают модифицированное москитоцидное растение *Impatiens walleriana*, где это модифицированное растение экспрессирует:

(a) экзогенную генную конструкцию, кодирующую слитый токсический пептид в клетках растения, продуцирующего нектар, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид связывается с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука Hv1a; и

(b) кассету терминатора, где кассета терминатора вырезает из нуклеиновой кислоты экзогенную генную конструкцию, находящуюся в клетках растения, отличных от клеток, продуцирующих нектар, и где модифицированное растение не может экспрессировать слитый токсический пептид в непродуцирующих нектар тканях модифицированного растения.

Пример 1.

В предшествующем исследовании на привлекательность для комаров, продукцию белков нектара и способность к генетической трансформации исследовали 37 видов растений. Среди этих кандидатов во всех областях лучшими были обычные садовые растения недотроги (*Impatiens walleriana*) (Chen and Kearney, *Acta Tropica* (2015), 146:1-88). После этого исследовали протеом и транскриптом нектара и производящих нектар органов и идентифицировали основную белок, продуцируемый в нектаре. Соответствующий ген из генома недотроги клонировали и определяли соответствующий промотор для применения для экспрессии пептидного токсина в нектаре, а также для получения трансгенных растений недотрог, экспрессирующих в нектаре маркерный ген, использовали нектарные промоторы *Arabidopsis*. В недотрогах с использованием специфичных для нектара промоторов *Arabidopsis* экспрессирован маркерный ген GUS, это демонстрирует, что эти растения могут служить в качестве средств доставки в нектар для чужеродных белков. Анализировали транскриптом нектара и контрольные транскриптомы листьев и стеблей недотрог.

Секвенирование и анализ генома *Impatiens walleriana* облегчают выделение промоторов нектара недотроги. Получены данные РНК-Seq для тканей нектара, стебля и листьев, а также данные масс-спектрометрии для белков нектара. Идентифицированы и клонированы промоторы высокоэкспрессированных белков нектара. Эти промоторы анализировали на экспрессию в трансгенных недотрогах в нектаре флуоресцентного маркера RFP.

Различные направленные пептиды тестируют на простое связывание с эпителием кишечника комара, включая эпителий кишечника *Aedes aegypti*. Идентифицированный направленный пептид представляет собой пептид, получаемый из домена III гликопротеина вируса денге. В *E. coli* получают слияния направленного пептида/eGFP и слитые белки суспендируют в 5% сахарозе для ингибирования. После кормления кишечник комара исследуют посредством флуоресцентной микроскопии.

Последовательности направленных пептидов удлиняют или укорачивают для оптимизации связывания. Лучшие связывающие направленные пептиды используют для получения слияний направленный пептид/инсектицидный пептид, включая слияния направленный пептид/инсектицидный пептид Hv1a. Эти слитые пептиды экспрессируют в *E. coli*, очищают и скармливают комарам для определения смертности *Aedes aegypti*. Сходный тест проводят на не являющихся мишенями организмами, таких как плодовые мушки, для демонстрации отсутствия нецелелевой токсичности.

Показано, что трансгенные растения, экспрессирующие направленные слитые пептиды, являются специфически устойчивыми к грибку корневой гнили *Fusarium* и тлям. В Bonning et al. (2014), *Nature*

Biotechnology, 32(1):102 токсический пептид паука Hv1a сливали с белком оболочки лютеовируса растений. Этот вирус в природе связывается с острием яйцеклада тлей посредством своего белка оболочки, перемещаясь в сцепленном состоянии внутри тли от растения к растению. Пептид Hv1a не токсичен для тлей при впитывании, но при слиянии с белком оболочки лютеовируса он очень токсичен и специфичен только для тли, но не для других насекомых.

Для тестирования множества инсектицидных пептидов на потенциал экспрессии в нектаре недотрог использовали самый сильный промотор нектара. Гены, в которых слиты лучшие кишечные и инсектицидные последовательности, экспрессировали в *E. coli* и тестировали на комарах посредством впитывания. Лучшую слитую конструкцию вводили в недотроги. Полученные проростки размножают для создания запаса для полевых испытаний из нескольких кластеров зачатков, посредством пролиферации получаемых в тканевой культуре недотрог. Проводят ненаправленные этические анализы, включая анализы для медоносных пчел, сетчатокрылых, коровок и одного вида бабочек, для демонстрации отсутствия нецелевой токсичности.

Проводят полевые испытания с использованием экспериментов с открытым мезокосмом. Тестовые сады для смешанных видов, содержащие несколько видов mosquitoцидного нектара, смешанного с конкурирующими садовыми растениями, расположены в сетчатой клетке 2,4×3 м в местах обитания. Добавили комаров и регистрировали смертность.

Пример 2.

Этот пример демонстрирует направленное действие на комаров *Aedes aegypti* посредством использования пептида из последовательности домена III гликопротеина вируса денге. Эта последовательность позволяет вирусу денге связываться с оболочками кишечника комара и начинать процесс инфекции комара. Активную часть этого гликопротеина сливали с флуоресцентным белком EGFP и слитый белок (включая стабилизирующий белок, SUMO) экспрессировали в *E. coli*. Затем очищенный белок добавляли в 10% раствор сахарозы и скармливали комарам способом вытеснения метки для гарантии того, что любая наблюдаемая в кишечнике флуоресценция действительно являлась результатом связывания с оболочкой кишечника.

Для экспрессии в *Escherichia coli* в компетентных штаммах *E. coli* BL21(DE3) и 10-бета из NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA) использовали вектор pE-SUMOstar из LifeSensors (Malvern, PA). Из IDT (Skokie, IL) получали gBlocks с оптимизированными для экспрессии в *E. coli* кодонами, содержащий последовательности EGFP, слияние денге/EGFP, токсин Hv1a и слияние денге/Hv1a. Все яйца комаров *Aedes aegypti* и личинки *Culex quinquefasciatus* получали из Benzon Research Inc. (Carlisle, PA).

Получали две другие идентичные конструкции для экспрессии в *E. coli* следующего:

- 1) маркер EGFP;
- 2) направленный маркер EGFP.

Каждая из этих конструкций являлась вектором SUMO, содержащим стабилизирующий белок SUMO, слитый с пептидом полезной нагрузки, как представлено на фиг. 1 и 2. Экспрессия находилась под контролем lac-оператора, промотора T7 и терминатора T7. Для последующей очистки добавляли метки bхHis. Для клональной селекции включали KanR и lad, для направления слитого белка к оболочкам кишечника *Aedes aegypti* использовали петлю домена III белка E флавивируса (SEQ ID NO: 1). EGFP представлял собой ген белка флуоресцентного маркера. Векторы SUMO являются коммерчески доступными, а EGFP представляет собой стандартный маркерный белок.

Для последовательностей EGFP слияния денге/EGFP, токсина Hv1a и слияния денге/Hv1a конструировали gBlocks. Направленный домен денге получали из последних 45 п.н. домена III гликопротеина E вируса денге. Синтезированные последовательности gBlock амплифицировали со специфическими для последовательности праймерами, сконструированными для фланкирования последовательностей с участками распознавания рестрикционных ферментов MfeI и BamHI соответственно, с использованием ДНК-полимеразы NEB Q5® High-Fidelity (NEB, PCR Using, (2018)). Эти продукты амплификации ПЦР запускали на 1% агарозном геле и гель очищали с использованием системы очистки гелей и ПЦР Promega Wizard® SV Гель и ПЦР Clean-Up System (Promega, Madison, WI (2018)). Очищенные продукты ПЦР и вектор pE-SUMOstar расщепляли рестрикционными ферментами MfeI и BamHI в течение 1 ч при 37°C. Затем эти расщепленные продукты запускали на 1% агарозном геле и гель очищали с использованием системы очистки Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Расщепленные продукты ПЦР лигировали в расщепленный вектор pE-SUMOstar с использованием ДНК-лигазы T4 NEB (NEB, Ligation Protocol. (2018)). Эти рекомбинантные плазмиды электропорировали в 10-бета компетентные *E. coli* NEB и трансформированные колонии затем селективно выращивали в течение ночи при 37°C на агарозных чашках, содержащих LB и 50 мкг/мл канамицина. Колонии с прошедшей трансформацией подтверждали с использованием ранее указанных праймеров с использованием Taq-полимеразы NEB, проводя инокуляцию в 10 мл LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и выращивали в течение ночи на шейкере при 37°C (NEB, PCR Protocol. (2018)). Положительные рекомбинантные плазмиды очищали из культур LB с использованием системы очистки Promega Wizard® Plus SV Minipreps и трансформировали в химически-компетентные BL21 *E. coli* NEB (Promega, Wizard® Plus. (2018)).

Положительные трансформанты BL21 выращивали в течение ночи на шейкере при 37°C в 20 мл 2× бульона YT, содержащего 50 мкл/мл канамицина. Вторичные культуры 500 мл 2× YT, содержащие 50 мкл/мл канамицина, инокулировали в 20 мл первичных культур и перемешивали (220 об/мин) при 37°C до OD₆₀₀=0,7. Экспрессию белка индуцировали в культурах с 0,1 mM IPTG и при перемешивании в течение ночи (180 об/мин) при 14°C. Клетки собирали посредством центрифугирования при 8000×g в течение 1 ч при 4°C. Клетки ресуспендировали в 1× PBS и лизировали в течение ночи при -20°C с 0,1 мг/мл лизоцима. Лизированные суспензии размораживали и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом устройстве с зондом при 40% амплитуде. Обработанную ультразвуком взвесь центрифугировали при 8000×g в течение 1 ч при 4°C. Супернатант собирали и очищали посредством хроматографии на колонке с никелем с использованием 1× PBS для связывающего и отмывочного буфера и 1× PBS, содержащего 500 mM имидазола, в качестве элюирующего буфера. Очищенные белки подвергали диализу в течение ночи при 4°C в 1× PBS с удалением имидазола. Очищенные белки запускали на 18% геле SDS-PAGE вместе с 1, 0,5, 0,25, 0,1 и 0,05 мг/мл BSA для подтверждения присутствия и определения их концентраций с использованием ImageJ (Schneider (2012)).

В пластиковые лотки, содержащие 1 л водопроводной воды и рыбный фарш (Tetramin®, Tetra, Blacksburg, VA), помещали яйца *Ae. aegypti*. Личинок *C. quinquefasciatus* переносили в пластиковые лотки после прибытия и вносили рубленый рыбный фарш, дополненный порошком печени. Все колонии поддерживали при 27±1°C, 70±5% RH. После достижения комарами стадий куколки их переносили в пластиковые пробирки для помощи в идентификации пола при достижении взрослой стадии.

Каждый EGFP пептид использовали для получения 10% раствора сахарозы. Буфер отрицательного контроля получали с использованием 1× PBS с получением 10% раствора сахарозы. Каждый флуоресцентный белок и контрольный раствор сахарозы ватным тампоном добавляли в 4 мл контейнер и каждый контейнер помещали в отдельную чистую камеру для анализа комаров. 10 самцов и 10 самок взрослых комаров *Ae. aegypti* и *C. quinquefasciatus* переносили в каждую камеру и содержали при 27±1°C, 70±5% RH. Через 2 суток комаров переносили в камеры, содержащие только 10% раствор сахарозы. Еще через 2 суток получали среднюю кишку. Флуоресценцию визуализировали с использованием Stereomicroscope SZX16 с блоком флуоресценции и фильтром GFP (возбуждение: 460-495 нм, испускание: 510 нм). Все эксперименты с вытеснением метки проводили в трех отдельных повторениях.

На фиг. 3 представлено, что EGFP успешно достигал оболочки кишечника *Aedes aegypti* и у самцов (слева), и у самок (справа) комаров. Нижние панели на фиг. 3 демонстрируют, что денге пептид-направленный EGFP оставался связанным с оболочками кишечника через 2 "импульсных" суток кормления комаров 10% сахарозой, содержащей направленный EGFP с последующими 2 сутками "очистки" с кормлением только 10% сахарозой. Средние панели на фиг. 3 демонстрируют, что в экспериментах с отрицательным контролем ненаправленный EGFP не оставался в кишечнике после очистки с 10% сахарозой. В эксперименте с нулевым контролем, представленным на верхних панелях фиг. 3, флуоресценции при непрерывном кормлении 10% сахарозой, суспендированной в буфере PBS, не наблюдали.

Пример 3.

Этот пример демонстрирует применение связывающего хозяина белка из вируса, специфичного для конкретного вида комара, для поражения этого вида комаров. Результаты демонстрируют направленное уничтожение комаров *Aedes aegypti* при использовании последовательности пептида из домена III гликопротеина вируса денге. Конкретно, слабую природную токсичность инсектицидного токсина Hv1a против *Aedes aegypti* значительно усиливали посредством его слияния с полученного из вируса денге направленного пептида.

В этом примере получали две конструкции, в остальном идентичные предыдущим двум конструкциям, использованным в примере 2, для экспрессии в *E. coli* следующего:

- 1) токсина Hv1a,
- 2) направленного токсина Hv1a.

Каждая из этих конструкций, представленных на фиг. 4 и 5, представляет собой вектор SUMO, содержащий стабилизационный белок SUMO, слитый с пептидом полезной нагрузки. Экспрессию контролировали оператором lac, промотором T7 и терминатором T7. Для последующей очистки добавляли метки 6×His. Присутствовали участки для KanR и lac для клональной селекции. Для направления слитого белка к оболочкам кишечника *Aedes aegypti* включали петлю домена III белка E флавивируса (SEQ ID NO: 1). "Токсин" относится к гену токсина Hv1a (SEQ ID NO: 2).

Каждый токсин разбавляли до 500 мкл/мл и использовали для получения 10% раствора сахарозы. Снова использовали 1× PBS для получения буфера отрицательного контроля с 10% раствором сахарозы. Каждый раствор токсина и контрольный раствор сахарозы добавляли в камеру для анализа комаров, как описано выше. 10 самцов и 10 самок взрослых комаров *Ae. aegypti* и *C. quinquefasciatus* переносили в каждую камеру и содержали при 27±1°C, 70±5% RH. Комарам позволяли потреблять 10% сахарозу, содержащую токсин Hv1a, токсин Hv1a, слитый с полученным из вируса денге пептидом, который поражал *Aedes*, или без добавленного белка ("буфер"). События гибели регистрировали каждые 24 ч в течение 3 суток. Для этого эксперимента проводили три повторения. Для анализа зарегистрированных данных

использовали GraphPad Prism 7 для определения значимости с использованием Log-рангового теста (Mantel-Cox) и для представления данных на кривой выживаемости с 95% доверительными интервалами (CI).

Результаты эксперимента с направленным токсином для используемых в качестве мишеней комаров *Ae. aegypti* представлены на фиг. 6. При кормлении только 10% сахарозой ("буфером") ни одного комара не умерло, и незначительную токсичность наблюдали в популяциях комаров, которые кормили 10% сахарозой, содержащей только токсин. В отличие от этого при использовании направленного на *Aedes* токсина, содержащего направленный пептид из вируса денге, регистрировали значительное усиление токсичности. Отрезки разбросов указывают 95% доверительные интервалы.

Пример 4.

Этот пример демонстрирует экстремальную специфичность направленного механизма, описываемого в настоящем документе. Результаты демонстрируют, что направленный токсин обладает не большей токсичностью, чем ненаправленный токсин, при потреблении комарами *Culex quinquefasciatus*, которые не являются хозяевами вируса денге. Другими словами, минимальная токсичность основного токсина направленным пептидом не усиливается.

Использовали те же конструкции, как описано в примере 3, и взрослым комарам *C. quinquefasciatus* также позволяли потреблять 10% сахарозу, содержащую токсин Hv1a, токсин Hv1a, слитый с полученным из вируса денге пептидом, направленным на *Aedes*, или 10% сахарозу без добавленного белка ("буфер"). Результаты исследования флуоресценции приведены на фиг. 7. Направленный на *Aedes* EGFP не связывался с оболочками кишечника комаров *Culex quinquefasciatus* ни у самцов, ни у самок. Нижние панели на фиг. 7 демонстрируют, что направленный пептидом денге EGFP в оболочках кишечника после 2 "импульсных" суток кормления 10% сахарозой, содержащей направленный EGFP с последующими 2 сутками "очистки" с кормлением только 10% сахарозой, не наблюдаются. Средние панели на фиг. 7 демонстрируют, что в экспериментах с отрицательным контролем ненаправленный EGFP не оставался в кишечнике после очистки с 10% сахарозой. Верхние панели фиг. 7 демонстрируют, что в эксперименте с нулевым контролем флуоресценции при непрерывном кормлении 10% сахарозой, суспендированной в буфере, не наблюдаются.

На фиг. 8 представлены результаты в отношении процента выживания не являющихся мишенями комаров *Culex quinquefasciatus*, которых кормили направленным на *Aedes* инсектицидным пептидом. Подсчет случаев гибели проводили ежедневно. Значимых отличий между комарами, которых кормили только 10% сахарозой ("буфером"), 10% сахарозой, содержащей токсин ("токсин") или направленный на *Aedes* токсин, содержащий направленный пептид из вируса денге ("денге/токсин"), не наблюдали. Отрезки разбросов указывают 95% доверительные интервалы.

Это демонстрирует, что направленный механизм является экстремально специфичным, даже на уровне рода. Ожидается, что критичный тест отсутствия токсичности для пчел и других не являющихся мишенями популяций даст те же результаты, так как этот более строгий тест демонстрирует специфичность даже между различными разновидностями комаров.

Ссылки

Приводимые ниже публикации, таким образом, включены в качестве ссылки.

- Bonning et al. (2014) *Nature Biotechnology* 32(1):102
 Hrobowski (2005) *Virology Journal* 2:49
 Chen & Kearney, *Acta Tropica* (2015) 146:1-88
 NEB. PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491).
 NEB (2018).
 Promega. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Promega (2018).
 NEB. Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202). NEB (2018).
 NEB. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273). NEB (2018).
 Promega. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Promega (2018).
 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675 (2012).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Москитоцидный токсин, содержащий слитый токсический пептид, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид представляет собой пептид, состоящий из SEQ ID NO: 1 из домена III гликопротеина вируса денге, где мишенью направленного на комаров пептида являются комары *Aedes aegypti*, и где слитый токсический пептид токсичен для комаров *Aedes aegypti*.

2. Москитоцидный токсин по п.1, где направленный на комаров пептид связывается с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*.

3. Москитоцидный токсин по п.1, где токсический пептид представляет собой пептид, у которого отсутствует токсичность для комаров без слияния с направленным на комаров пептидом.

4. Москитоцидный токсин по п.1, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука *Hv1a*.

5. Москитоцидный токсин по п.1, где у слитого токсического пептида отсутствует токсичность для других видов комаров.

6. Москитоцидный токсин по п.1, дополнительно содержащий носитель.

7. Способ получения модифицированного растения, экспрессирующего москитоцидные токсины, включающий

индукцию экспрессии экзогенной генной конструкции, кодирующей слитый токсический пептид в клетках-мишенях растения, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид представляет собой пептид, состоящий из SEQ ID NO: 1 из домена III гликопротеина вируса денге, где мишенью направленного на комаров пептида являются комары *Aedes aegypti*, и где слитый токсический пептид токсичен для комаров *Aedes aegypti*; и

получение модифицированного растения, экспрессирующего слитый токсический пептид.

8. Способ по п.7, где растение представляет собой продуцирующее нектар растение, клетки-мишени растения являются продуцирующими нектар клетками, а модифицированное растение экспрессирует слитый токсический пептид в нектар растения.

9. Способ по п.8, где растение представляет собой *Impatiens walleriana*.

10. Способ по п.7, где направленный на комаров пептид связывается с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*.

11. Способ по п.7, где токсический пептид представляет собой пептид с токсичностью для комаров.

12. Способ по п.7, где токсический пептид представляет собой пептид, у которого отсутствует токсичность для комаров без слияния с направленным на комаров пептидом.

13. Способ по п.7, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука *Hv1a*.

14. Способ по п.7, где у слитого токсического пептида отсутствует токсичность для других видов комаров.

15. Способ по п.7, где экзогенная генная конструкция содержит промотор, специфичный для растения, ген, кодирующий направленный на комаров пептид, и ген, кодирующий токсический пептид.

16. Способ по п.7, где этап индукции экспрессии экзогенной генной конструкции включает трансформацию по меньшей мере одной клетки растения экзогенной генной конструкцией с получением модифицированного растения, экспрессирующего слитый токсический пептид.

17. Модифицированное растение, получаемое способом по п.7.

18. Способ получения модифицированного растения, экспрессирующего москитоцидные токсины в нектар растения, включающий

индукцию экспрессии экзогенной генной конструкции, кодирующей слитый токсический пептид в клетках растения, продуцирующих нектар, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид представляет собой пептид, состоящий из SEQ ID NO: 1 из домена III гликопротеина вируса денге, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука *Hv1a* и где растение представляет собой *Impatiens walleriana*; и

получение модифицированного растения, экспрессирующего слитый токсический пептид в нектар модифицированного растения и не экспрессирующего слитый токсический пептид в непродуцирующие нектар ткани модифицированного растения.

19. Модифицированное растение, получаемое способом по п.18.

20. Модифицированное москитоцидное растение, где модифицированное растение экспрессирует экзогенную генную конструкцию, кодирующую слитый токсический пептид в клетках-мишенях растения, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид представляет собой пептид, состоящий из SEQ ID NO: 1 из домена III гликопротеина вируса денге, где мишенью направленного на комаров пептида являются комары *Aedes aegypti*, и где слитый токсический пептид токсичен для комаров *Aedes aegypti*.

21. Модифицированное москитоцидное растение по п.20, где растение представляет собой продуцирующее нектар растение, клетки-мишени растения представляют собой продуцирующие нектар клетки и модифицированное москитоцидное растение экспрессирует слитый токсический пептид в нектар растения.

22. Модифицированное москитоцидное растение по п.21, где растение представляет собой *Impatiens walleriana*.

23. Модифицированное москитоцидное растение по п.20, где направленный на комаров пептид связывается с эпителием кишечника комаров *Aedes aegypti*.

24. Модифицированное mosquitoидное растение по п.20, где токсический пептид представляет собой пептид, у которого отсутствует токсичность для комаров без слияния с направленным на комаров пептидом.

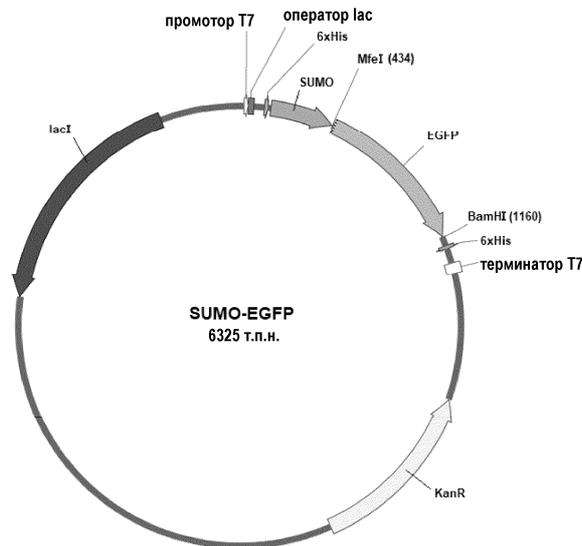
25. Модифицированное mosquitoидное растение по п.20, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука Hv1a.

26. Модифицированное mosquitoидное растение по п.20, где у слитого токсического пептида отсутствует токсичность для других видов комаров.

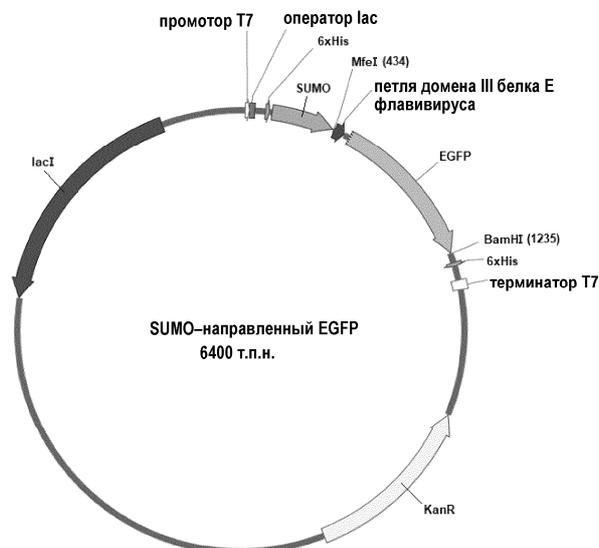
27. Модифицированное mosquitoидное растение по п.20, где экзогенная генная конструкция содержит промотор, специфичный для нектара растения, ген, кодирующий направленный на комаров пептид, и ген, кодирующий токсический пептид.

28. Семена модифицированного растения по п.20.

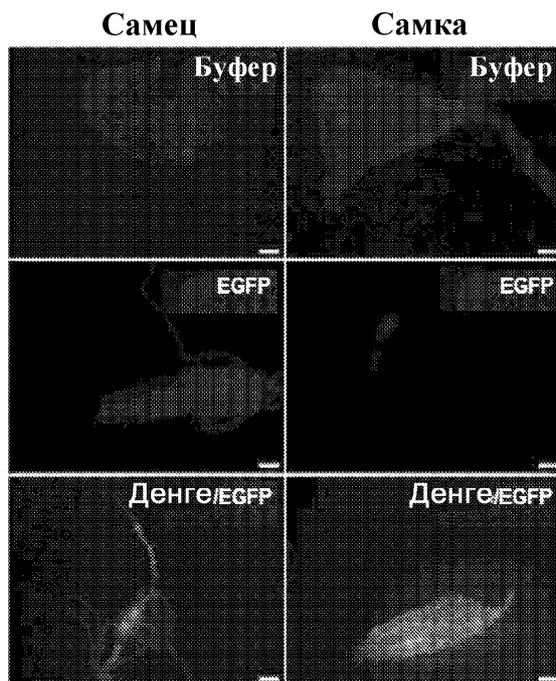
29. Модифицированное mosquitoидное растение *Impatiens walleriana*, где модифицированное растение экспрессирует экзогенную генную конструкцию, кодирующую слитый токсический пептид в клетках растения, продуцирующего нектар, где слитый токсический пептид содержит направленный на комаров пептид, слитый с токсическим пептидом, где направленный на комаров пептид представляет собой пептид, состоящий из SEQ ID NO: 1 из домена III гликопротеина вируса денге, где токсический пептид представляет собой токсический пептид паука Hv1a, и где модифицированное растение не способно экспрессировать слитый токсический пептид в непродуцирующих нектар тканях модифицированного растения.



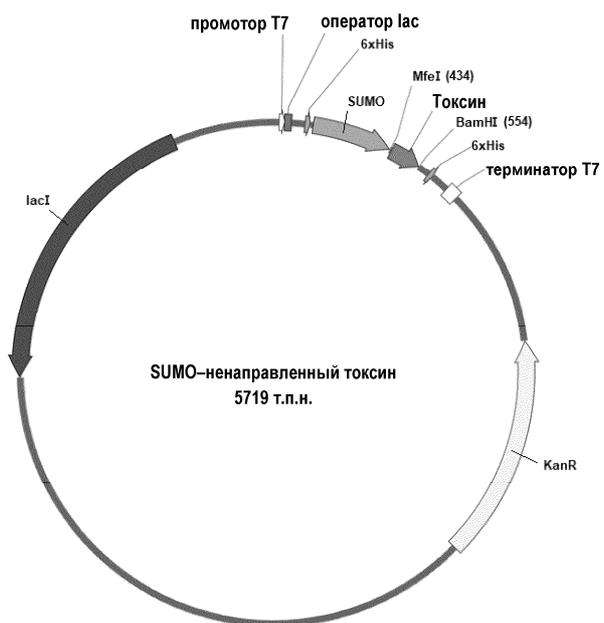
Фиг. 1



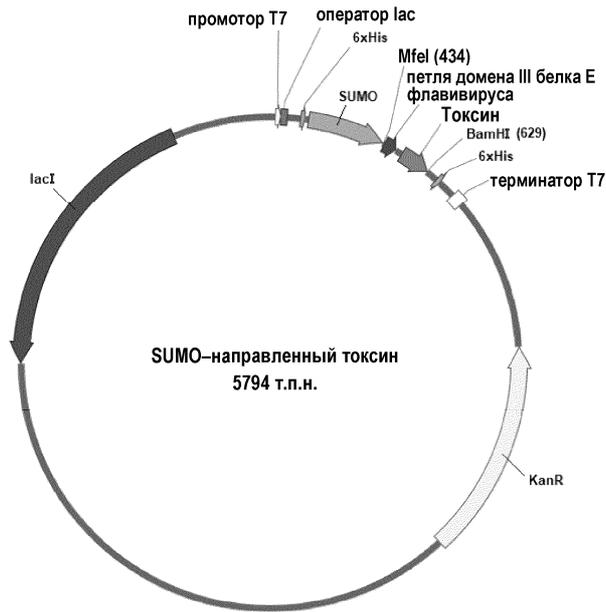
Фиг. 2



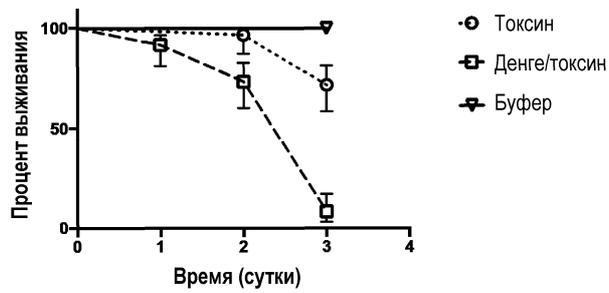
Фиг. 3



Фиг. 4



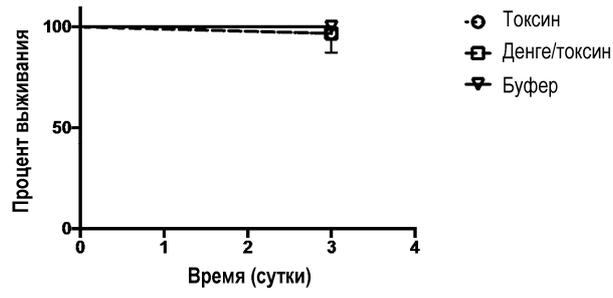
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8