

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291560 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.29

(22) Дата подачи заявки
2020.10.20

(51) Int. Cl. A61K 38/09 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
C07K 7/23 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ МИЦЕЛЛА И СПОСОБ СБОРКИ IN VIVO

(31) 62/939,247; 16/741,680

(32) 2019.11.22; 2020.01.13

(33) US

(86) PCT/US2020/056449

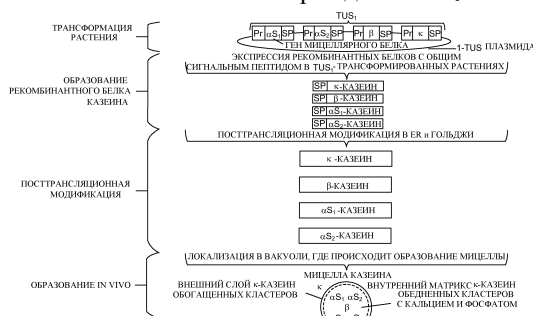
(87) WO 2021/101647 2021.05.27

(71) Заявитель:
МОЦА ФУДС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дж. Тобин Кори (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Способ сборки in vivo рекомбинантной мицеллы, предусматривающий введение плазмиды в растительную клетку, где плазида включает сегмент дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для кодирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) белка в мицелле казеина, сегмент ДНК транскрибируется и транслируется, образование рекомбинантных белков казеинов в растительной клетке, где рекомбинантные белки казеины включают к-казеин и по меньшей мере один из αS_1 -казеина, αS_2 -казеина, β -казеина, и сборку in vivo рекомбинантной мицеллы внутри растительной клетки, где внешний слой рекомбинантной мицеллы обогащен к-казеином, внутренний матрикс рекомбинантной мицеллы включает по меньшей мере один из αS_1 -казеина, αS_2 -казеина, β -казеина.



A1

202291560

202291560

A1

РЕКОМБИНАНТНАЯ МИЦЕЛЛА И СПОСОБ СБОРКИ IN VIVO

Описание

Ссылка на перечень последовательностей, поданный посредством EFS-WEB

[0001] Содержание текстового файла ASCII перечня последовательностей под названием «0107-001 P-PCT _Sequence_Listing.txt» размером 31 КБ было создано 11 января 2020 г. и подано в электронном виде посредством EFS-Web для соответствующей заявки США № 16/741680 от 13 января 2020 г., а также подано в электронном виде посредством EFS-Web для соответствующей международной заявки PCT от 20 октября 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на родственные заявки

[0002] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/939247, поданной 22 ноября 2019, и предварительной заявкой на выдачу патента США № 16/741680, поданной 13 января 2020, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники настоящего изобретения

[0003] Вариант осуществления настоящего изобретения в целом относится к мицелле и, более конкретно, к рекомбинантной мицелле и способу сборки in vivo в растительной клетке.

Предпосылки создания настоящего изобретения

[0004] Мицеллы казеина составляют более 80% белка коровьего молока и являются ключевым компонентом всех молочных сыров. Мицеллы казеина включают отдельные белки казеины, продуцируемые в молочных железах крупного рогатого скота и других жвачных животных. Производство молока в промышленном масштабе, в ходе которого молоко обрабатывают с получением этих мицелл казеина, в основном в виде творога для производства сыра, обычно проводят на крупных молочных фермах и часто неэффективным образом, нанося ущерб окружающей среде и животным. Молочные коровы вносят существенный вклад в выбросы парниковых газов, потребляют значительно больше количества воды, чем количество молока, которое они производят, и обычно страдают от удаления рогов, удаления роговых бугорков, мастита, планового принудительного осеменения и забоя молочных телят в возрасте до четырех-шести месяцев.

[0005] Соответственно, существует потребность в системе экспрессии казеина *in vivo* на основе растительной клетки, которая обеспечивает очистку биологически активных белков казеинов, экономически выгодным образом в промышленном масштабе.

[0006] Поиск решения этих проблем продолжался в течение длительного периода времени, но предшествующие разработки не раскрывают и не предполагают никаких решений, и, таким образом, решения этих проблем долго не были доступны специалистам в данной области техники.

Сущность настоящего изобретения

[0007] Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу сборки *in vivo* рекомбинантной мицеллы, предусматривающему: введение плазмиды в растительную клетку, где плазида включает сегмент дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для кодирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) белка в мицелле казеина, сегмент ДНК транскрибируется и транслируется, образование рекомбинантных белков казеинов в растительной клетке, где рекомбинантные белки казеины включают κ -казеин и по меньшей мере один из αS_1 -казеина, αS_2 -казеина, β -казеина, и сборку *in vivo* рекомбинантной мицеллы внутри растительной клетки, где внешний слой рекомбинантной мицеллы обогащен κ -казеином, а внутренний матрикс рекомбинантной мицеллы включает по меньшей мере один из αS_1 -казеина, αS_2 -казеина, β -казеина.

[0008] Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантной мицелле, включающей внешний слой, обогащенный κ -казеином, и внутренний матрикс, включающий по меньшей мере один из αS_1 -казеина, αS_2 -казеина, β -казеина.

[0009] Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к плазмиде, включающей сегмент дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для кодирования белка в мицелле казеина, где сегмент ДНК включает промотор и N-концевой сигнальный пептид.

[0010] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения содержат другие стадии или элементы в дополнение к упомянутым выше или вместо них. Стадии или элементы станут очевидными для специалистов в данной области техники посредством следующего подробного описания со ссылками на прилагаемые чертежи.

Краткое описание чертежей

[0011] На фиг. 1 приведен пример способа образования *in vivo* мицелл казеина согласно варианту осуществления.

[0012] На фиг. 2 приведен пример схематического изображения плазмиды, применяемой согласно фиг. 1.

[0013] На фиг. 3А приведен пример с дополнительными детальными характеристиками от трансформации растения до посттрансляционной модификации.

[0014] На фиг. 3В приведен пример с дополнительными детальными характеристиками образования *in vivo*.

[0015] На фиг. 3С приведен пример схематического изображения транскрипции белков, которые придают устойчивость к гербицидам трансформированному растению.

[0016] На фиг. 3D приведен пример схематического изображения подавления нативных запасных белков семени посредством РНКi, транскрибируемой частью плазмиды, показанной на фиг. 1.

[0017] На фиг. 3Е приведен пример схематического изображения транскрипции части плазмиды согласно фиг. 1 и получения белков, используемых для увеличения концентрации кальция в растительной клетке.

[0018] На фиг. 3F приведен пример схематического изображения транскрипции части плазмиды согласно фиг. 1 и получения белков, используемых для увеличения концентрации фосфата в растительной клетке.

[0019] На фиг. 3G приведен пример с дополнительными детальными характеристиками образования *in vivo*.

[0020] На фиг. 4 приведен пример схематического изображения части плазмиды в *Arabidopsis*.

[0021] На фиг. 5 приведен пример схематического изображения части плазмиды в *Arabidopsis* для маркера скрининга в растениях.

[0022] На фиг. 6 приведен пример схематического изображения части плазмиды в растениях сои.

[0023] На фиг. 7 приведен пример схематического изображения части плазмиды в растениях сои для устойчивости растений к гербицидам.

[0024] На фиг. 8 приведен пример схематического изображения части плазмиды согласно фиг. 1 для растений сои для подавления нативных запасных белков семян в растениях.

[0025] На фиг. 9 приведен пример схематического изображения части плазмиды для растений сои для регулирования внутриклеточных концентраций минералов, которые могут усиливать образование мицелл.

[0026] На фиг. 10 приведен пример способа очистки мицелл, образующихся *in vivo* в растениях сои.

Подробное описание настоящего изобретения

[0027] Следующие варианты осуществления описаны достаточно подробно для того, чтобы специалисты в данной области техники могли реализовать и использовать настоящее изобретение. Следует понимать, что другие варианты осуществления очевидны на основании настоящего раскрытия, и что система, способ или механические изменения могут быть получены без отклонения от объема варианта осуществления настоящего изобретения.

[0028] В нижеследующем описании приведены многочисленные конкретные подробные характеристики для обеспечения полного понимания настоящего изобретения. Однако очевидно, что настоящее изобретение может быть реализовано на практике без этих конкретных характеристик. Для того, чтобы не усложнять понимание варианта осуществления настоящего изобретения, некоторые хорошо известные методики, конфигурации системы и стадии способа подробно не раскрыты.

[0029] Чертежи, показывающие варианты осуществления системы, являются полусхематическими и не приведены в масштабе, и, в частности, некоторые размеры раскрыты для ясности представления и показаны на чертежах в увеличенном виде. Таким же образом, хотя виды на чертежах для простоты описания обычно показывают аналогичные ориентации, изображение на приведенных чертежах по большей части является произвольным. Как правило, настоящее изобретение можно использовать в любой ориентации.

[0030] В контексте настоящего изобретения термин «изобретение» или «настоящее изобретение» не предназначен для ограничения какого-либо одного конкретного варианта осуществления настоящего изобретения, но применяется в целом ко всем без исключения вариантам осуществления настоящего изобретения, как описано в формуле изобретения и описании.

[0031] На фиг. 1 показан пример способа образования *in vivo* мицелл казеина согласно варианту осуществления. В этом примере на фиг. 1 показан способ образования мицелл казеина путем трансформации растений, образования рекомбинантного белка казеина, посттрансляционной модификации и образования *in vivo*. В качестве конкретного примера на фиг. 1 приведено схематическое изображение элементов плазмиды этого варианта осуществления и ее использования для создания мицелл *in vivo* в растительной клетке.

[0032] В этом примере трансформации растения растение трансформируют с использованием плазмиды, включающей один набор единиц транскрипции. В контексте настоящего изобретения термин «плазида» представляет собой молекулу

дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), способную к репликации в клетке-хозяине и с которой может быть функционально связан другой сегмент ДНК для того, чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента ДНК. Что касается этого примера, способы трансформации растений включают баллистическую трансфекцию, как показано в патентах США № 5015580, 5550318, 5538880, 6153812, 6160208, 6288312 и 6399861, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Способы трансформации растений также включают трансформацию, опосредованную агробактериями, как показано в патентах США № 5159135, 5824877, 5591616 и 6384301, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Клетки-реципиенты для трансформации растений включают без ограничения клетки меристемы, каллус, незрелые зародыши, экспланты подсемядольного колена, экспланты семядолей, экспланты листьев и гаметы, такие как микроспоры, пыльца, мужские половые клетки и ооциты, и любые клетки, из которых фертильное растение может быть регенерировано, как описано в патентах США № 6194636, 6232526, 6541682 и 6603061 и публикации заявки на патент США US 2004/0216189 A1, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0033] Продолжая описание этого примера трансформации растения, плаزمид, включающая отдельный набор единиц транскрипции, показана и обозначена в виде сокращения на фиг. 1 как 1-TUS ПЛАЗМИДА. Набор единиц транскрипции, включенный в эту плазмиду, представляет собой набор единиц транскрипции 1, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 1 как TUS₁. В контексте настоящего изобретения термин «набор единиц транскрипции» представляет собой сегмент ДНК, включающий одну или более единиц транскрипции. Назначение набора единиц транскрипции включает без ограничения экспрессию белка, подавление генов, продукцию регуляторной рибонуклеиновой кислоты (РНК) и устойчивость к гербицидам. В контексте настоящего изобретения термин «единица транскрипции» представляет собой сегмент ДНК, включающий по меньшей мере промоторную ДНК и транскрибируемую ДНК. В контексте настоящего изобретения термин «промотор» означает регуляторную ДНК для инициации транскрипции РНК. «Растительный промотор» представляет собой промотор, способный иницировать транскрипцию в растительных клетках независимо от того, является ли его источником растительная клетка или нет. В контексте настоящего изобретения «терминатор» означает любую последовательность ДНК, которая вызывает терминацию транскрипции РНК.

[0034] Продолжая описание этого примера трансформации растения, как показано на фиг. 1 в качестве варианта осуществления, набор единиц транскрипции 1 включает четыре сегмента ДНК, причем каждый кодирует РНК одного из четырех белков, обнаруживаемых

в мицелле: αS_1 казеин, αS_2 казеин, β казеин и κ казеин. В целях ясности и в качестве примера, гены, кодирующие αS_1 казеин, αS_2 казеин, β казеин и κ казеин, показаны и обозначены в сокращенном виде на фиг. 1 как αS_1 , как αS_2 , как β и как κ , соответственно, и показаны и обозначены в сокращенном виде на фиг. 1 как ГЕН МИЦЕЛЛЯРНОГО БЕЛКА. Каждый сегмент ДНК, кодирующий РНК одного из четырех белков, обнаруживаемых в мицелле казеина, функционально связан с промотором, показанным и обозначенным в сокращенном виде на фиг. 1 как Р, и включает тканеспецифический N-концевой сигнальный пептид растительного происхождения, показанный и обозначенный в сокращенном виде на фиг. 1 как SP. В контексте настоящего изобретения термин «функционально связанный» представляет собой ассоциацию двух или более фрагментов ДНК в конструкции ДНК таким образом, что функция одного из них контролируется другим, например, ДНК, кодирующая белок, связанная с ДНК, кодирующей промотор. Согласно некоторым вариантам осуществления N-концевой сигнальный пептид направляет рекомбинантные белки казеины в вакуоли растений. Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные белки казеины нацелены на эндоплазматический ретикулум и удерживаются в нем.

[0035] В качестве примера образования рекомбинантного белка казеина, когда четыре сегмента ДНК, включенные в набор единиц транскрипции 1, транскрибируются и транслируются в трансгенном растении (не показано), четыре рекомбинантных белка казеина, каждый из которых включает тканеспецифический сигнальный пептид растительного происхождения, образуются в цитоплазме растительной клетки. Рекомбинантные белки казеины показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 1 как αS_1 -КАЗЕИН, как αS_2 -КАЗЕИН, как β -КАЗЕИН и как κ -КАЗЕИН, соответственно, и для краткости также упоминаются в настоящем документе как «рекомбинантные белки казеины». В контексте настоящего изобретения термин «трансгенное» растение представляет собой растение, геном которого был изменен путем стабильной интеграции рекомбинантной ДНК. В качестве примера стабильной интеграции трансгенное растение включает растение, регенерированное из первоначально трансформированной растительной клетки, и потомство трансгенных растений из более поздних поколений или скрещиваний трансформированного растения. В контексте настоящего изобретения термин «рекомбинантная ДНК» относится к ДНК, которая была синтезирована, собрана или сконструирована вне клетки. Примеры рекомбинантной ДНК могут включать ДНК, содержащую ДНК природного происхождения или комплементарную ДНК (кДНК), или синтетическую ДНК.

[0036] В отношении этого примера посттрансляционной модификации, как показано на фиг. 1, четыре рекомбинантных белка казеина в цитоплазме растительной клетки включают αS_1 -казеин, αS_2 -казеин, β -казеин и κ -казеин, каждый из которых включает сигнальный пептид (SP), который локализует рекомбинантный белок казеин в специфических органеллах, например, в секреторном пути и вакуолях запаса белка в растительной клетке. Сигнальный пептид удаляется из рекомбинантных белков казеинов в ходе посттрансляционной модификации, происходящей в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи растительной клетки. В целях ясности, в этом примере эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 1 как ER и как Гольджи, соответственно. Согласно этому варианту осуществления и примеру фосфорилирование происходит на рекомбинантных белках казеинов до, в ходе или после миграции в конкретную ткань, как показано на фиг. 1 в виде кружков, окружающих букву «Р», прикрепленную к каждому из рекомбинантных белков казеинов. Согласно другим вариантам осуществления и примерам может иметь место одна или более посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков казеинов, включая фосфорилирование, гликозилирование, убиквитинирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование, липидирование и протеолиз. Согласно другим вариантам осуществления в рекомбинантных белках казеинов не происходят посттрансляционные модификации, или, другими словами, посттрансляционная модификация является необязательной.

[0037] Продолжая описание этого примера образования *in vivo* в качестве варианта осуществления, внешний слой мицеллы обогащен рекомбинантным κ -казеином, показанным и обозначенным в виде сокращения на фиг. 1 как κ , а внутренний матрикс мицеллы включает рекомбинантный αS_1 -казеин, рекомбинантный αS_2 -казеин, рекомбинантный β -казеин, кальций и фосфат, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 1 как αS_1 , αS_2 , как αS и β , соответственно. Образование мицелл усиливается посредством присутствия внутриклеточного кальция и фосфата, которые показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 1 как Ca и P, соответственно.

[0038] На фиг. 2 приведен пример схематического изображения плазмиды, применяемой согласно фиг. 1. В качестве конкретного примера на фиг. 2 приведено схематическое изображение элементов плазмиды этого варианта осуществления.

[0039] В этом примере трансформации растения на фиг. 1 вариант осуществления относится к растению, трансформированному одной или более транспортными ДНК, включая один или более наборов единиц транскрипции. В контексте настоящего

изобретения термин «транспортная ДНК» (Т-ДНК) представляет собой ДНК, которая интегрируется или интегрирована в геном.

[0040] Например, опосредованная агробактериями трансформация Т-ДНК является частью бинарной плазмиды, которая фланкирована пограничными последовательностями Т-ДНК, и бинарную плазмиду переносят в штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий обезвреженную плазмиду, индуцирующую опухоль. Также, например, для биолистической опосредованной трансформации используют генную пушку для доставки Т-ДНК в клетки, которая обычно представляет собой биолистическую конструкцию, содержащую промоторные и терминаторные последовательности, репортерные гены и пограничные последовательности или сигнальные пептиды.

[0041] Продолжая описание примера Т-ДНК, используемой для трансформации растения согласно варианту осуществления, Т-ДНК включает четыре набора единиц транскрипции: набор единиц транскрипции 1, набор единиц транскрипции 2, набор единиц транскрипции 3 и набор единиц транскрипции 4. В целях ясности, набор единиц транскрипции 1, набор единиц транскрипции 2, набор единиц транскрипции 3 и набор единиц транскрипции 4 показаны и приведены в виде сокращения на фиг. 2 как TUS₁, как TUS₂, как TUS₃ и как TUS₄, соответственно.

[0042] В этом примере в качестве варианта осуществления TUS₁ включает одну единицу транскрипции для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицелле казеина согласно фиг. 2: единица транскрипции 1-1 включает ДНК, кодирующую α S₁-казеин, единица транскрипции 1-2 включает ДНК, кодирующую β -казеин, единица транскрипции 1-3 включает ДНК, кодирующую κ -казеин, и единица транскрипции 1-4 включает ДНК, кодирующую α S₁-казеин. В целях ясности и краткости единица транскрипции 1-1, единица транскрипции 1-2, единица транскрипции 1-3 и единица транскрипции 1-4 показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 2 как TU₁₋₁, как TU₁₋₂, как TU₁₋₃ и как TU₁₋₄, соответственно. Каждая единица транскрипции в TUS₁ может также включать ДНК, кодирующую один и тот же сигнальный пептид растительного происхождения. Кроме того, каждая единица транскрипции в TUS₁ включает промотор и терминатор транскрипции.

[0043] Продолжая описание этого примера в качестве варианта осуществления, TUS₂ включает одну единицу транскрипции, показанную и обозначенную в виде сокращения на фиг. 2 как TU₂₋₁, которая включает промотор, ДНК, кодирующую фосфинотрицинацетилтрансферазу, и терминатор транскрипции. Согласно другим вариантам осуществления TUS₂ может включать один или более генов, кодирующих маркер отбора, который может придавать устойчивость к гербицидам или антибиотикам, что

делает возможным отбор трансформированных растений, продуцирующих мицеллы *in vivo*. Гены, обеспечивающие селекцию трансформированных растений, включают гены, придающие устойчивость к антибиотикам, включая, например, канамицин, гигромицин В, гентамицин и блеомицин. Гены, обеспечивающие отбор трансформированных растений, также включают гены, придающие устойчивость к гербицидам, включая, например, гербицид глифосат, гербицид фосфинотрицин, гербицид оксинил, гербицид имидазолинон, гербицид динитроанилин, гербицид пиридин, гербицид сульфонилмочевина, гербицид биалафос, гербицид сульфаниламид и гербицид глюфосинат. Примеры таких маркеров отбора проиллюстрированы в патентах США № 5550318, 5633435, 5780708 и 6118047, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно другим вариантам осуществления TUS₂ включает один или более генов, экспрессирующих маркер скрининга, который обеспечивает визуальную идентификацию трансформированных растений, продуцирующих мицеллы *in vivo*. Гены, экспрессирующие маркер скрининга, включают гены, кодирующие окрашенный или флуоресцентный белок, включая, например, люциферазу или зеленый флуоресцентный белок (патент США № 5491084, включенный в настоящий документ посредством ссылки), и гены, экспрессирующие β-глюкуронидазу или ген uidA (патент США № 5599670, включенный в настоящий документ посредством ссылки), для которых известны различные хромогенные субстраты. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из генов, кодирующих маркер отбора или скрининга, функционально связан с индуцируемым промотором, таким как, например, промотор NOS, или тканеспецифическим промотором, таким как, например, промотор из α'-субъединицы β-конглицинина сои, так что можно регулировать трансляцию маркеров отбора или скрининга.

[0044] Продолжая описание этого примера в качестве варианта осуществления, TUS₃ включает две единицы транскрипции, которые приводят к нетранслируемым молекулам РНК, которые подавляют трансляцию генов нативного белка семян. Первая единица транскрипции в TUS₃, единица транскрипции 3-1, включает смысловую нить или кодирующую нить ДНК, кодирующей глицинин 1 сои, и антисмысловую нить или некодирующую нить ДНК, кодирующей глицинин 1 сои, разделенные интроном IV2 картофеля. В целях ясности и краткости, единица транскрипции 3-1, смысловая нить или кодирующая нить ДНК, кодирующей глицинин 1 сои, и антисмысловая нить или некодирующая нить ДНК, кодирующей глицинин 1 сои, интрон IV2 картофеля показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 2 как TU₃₋₁, как GY1 СМЫСЛОВАЯ, как GY1 АНТИСМЫСЛОВАЯ и как IV2 ИНТРОН, соответственно. Вторая единица транскрипции в TUS₃, единица транскрипции 3-2, включает смысловую нить или кодирующую нить ДНК,

кодирующей β -конглицинин 1, и антисмысловую нить или некодирующую нить ДНК, кодирующей β -конглицинин 1, разделенные интроном IV2 картофеля. В целях ясности и краткости, единица транскрипции 3-2, смысловая нить или кодирующая нить ДНК, кодирующей β -конглицинин 1, антисмысловая нить или некодирующая нить ДНК, кодирующей β -конглицинин 1, и интрон IV2 картофеля показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 2 как TU₃₋₂, как CG1 СМЫСЛОВАЯ, как CG1 АНТИСМЫСЛОВАЯ и как IV2 ИНТРОН, соответственно.

[0045] Согласно другим вариантам осуществления TUS₃ включает другие единицы транскрипции, которые приводят к нетранслируемым молекулам РНК, которые подавляют трансляцию генов нативного белка семян. Например, согласно другим вариантам осуществления TUS₃ включает одну единицу транскрипции, единицу транскрипции 3-1, которая включает промотор гена GY4 сои (SEQ ID NO:15), микроРНК miR319a из *Arabidopsis thaliana*, которая была модифицирована таким образом, что гомологичные плечи шпильки микроРНК содержат 21 нуклеотидную последовательность, совпадающую с частью последовательности гена GY1 сои (SEQ ID NO:10), и терминатор транскрипции NOS (SEQ ID NO:35) (не показан).

[0046] Продолжая описание этого примера в качестве варианта осуществления, TUS₄ включает две единицы транскрипции, которые кодируют белки, которые изменяют внутриклеточную среду таким образом, что оптимизируют продукцию мицелл, обладающих необходимыми свойствами, включая размер, содержание минералов, содержание белка, распределение белка и массу. Первая единица транскрипции в TUS₄, единица транскрипции 4-1, включает промотор, ДНК, кодирующую оксалатдекарбоксилазу, и терминатор транскрипции. В целях ясности и краткости, единица транскрипции 4-1 показана и обозначена в виде сокращения на фиг. 2 как TU₄₋₁. Вторая единица транскрипции в TUS₄, единица транскрипции 4-2, включает промотор, ДНК, кодирующую фитазу, и терминатор транскрипции. В целях ясности и краткости, единица транскрипции 4-2 показана и обозначена в виде сокращения как TU₄₋₂. Согласно этому варианту транскрипция и трансляция TU₄₋₁ приводит к ферменту, расщепляющему оксалаты, который увеличивает количество свободного внутриклеточного кальция, доступного для захвата и включения в ходе образования мицелл. Кроме того, согласно этому варианту осуществления транскрипция и трансляция TU₄₋₂ приводит к ферменту фитаза, который увеличивает количество свободного внутриклеточного фосфата, доступного для захвата и включения в ходе образования мицелл. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из генов, кодирующих ферменты, расщепляющие оксалаты, или ферменты фитазы, функционально связан с конститутивным промотором,

тканеспецифическим промотором или индуцируемым промотором, таким как, например, промотор нопалинсинтазы или промотор из гена β -конглицинина сои, так что можно регулировать трансляцию белков, которые изменяют внутриклеточную среду. Согласно некоторым вариантам осуществления TUS₄ включает как единицу транскрипции 4-1, которая увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция, так и единицу транскрипции 4-2, которая увеличивает внутриклеточную концентрацию фосфата. Согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает только единицу транскрипции 4-1, которая увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция. Согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает только единицу транскрипции 4-2, которая увеличивает внутриклеточную концентрацию фосфата.

[0047] Согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает единицы транскрипции, которые повышают внутриклеточную концентрацию кальция посредством экспрессии фермента оксалатоксидазы (не показано). В качестве примера, согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает одну единицу транскрипции, единицу транскрипции 4-1, которая включает промотор из гена GY4 сои (SEQ ID NO:15), кодирующую последовательность оксалатоксидазы 1 из пшеница, которая была кодон-оптимизирована для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:9), и терминатор транскрипции NOS (SEQ ID NO:35) (не показан). Согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает единицы транскрипции, которые повышают внутриклеточную концентрацию фосфата посредством подавления экспрессии гена мио-инозитол-3-фосфатсинтазы (MIPS1) сои. В качестве примера, согласно другим вариантам осуществления TUS₄ включает одну единицу транскрипции, единицу транскрипции 4-2, которая включает промотор из гена сои GY4 (SEQ ID NO:15), часть кодирующей последовательности MIPS1, в которой отсутствует стартовый кодон (SEQ ID NO:21), интрон IV2 картофеля (SEQ ID NO:25), антисмысловую последовательность MIPS1 (SEQ ID NO:22) и терминатор транскрипции (SEQ ID NO:35) (не показан).

[0048] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения наборы единиц транскрипции собраны в числовом порядке. Согласно другим вариантам осуществления наборы единиц транскрипции могут быть собраны в любом порядке.

[0049] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит набор единиц транскрипции TUS₁, TUS₂, TUS₃ и TUS₄. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит только набор единиц транскрипции TUS₁.

[0050] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁ и TUS₂. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁, TUS₂ и TUS₃. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁, TUS₂ и TUS₄.

[0051] Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁ и TUS₃. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁, TUS₃ и TUS₄.

[0052] Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения растение трансформировано плазмидой, которая содержит наборы единиц транскрипции TUS₁ и TUS₄. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения трансгенные растения получают путем скрещивания первого растения, трансформированного плазмидой, содержащей один или более наборов единиц транскрипции, со вторым нетрансформированным растением. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения трансгенные растения получают путем скрещивания первого растения, которое было трансформировано плазмидой, содержащей один или более, но не все, из наборов единиц транскрипции, необходимых для образования мицелл *in vivo*, со вторым растением, имеющим один или более наборов единиц транскрипции, где по меньшей мере один из наборов единиц транскрипции присутствует во втором растении и не присутствует в первом растении.

[0053] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения трансгенные растения получают путем скрещивания первого растения, которое было трансформировано плазмидой, содержащей один или более наборов единиц транскрипции, обеспечивающих образование мицелл *in vivo*, со вторым растением, обладающим другим признаком, таким как устойчивость к гербицидам или устойчивость к вредителям.

[0054] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения трансгенные растения получают путем выращивания поколений потомства растений, которые были трансформированы плазмидой, содержащей один или более наборов единиц транскрипции, обеспечивающих образование мицелл *in vivo*. Согласно другим вариантам осуществления трансгенные растения получают путем выращивания поколений потомства трансгенного растения, полученного путем скрещивания одного или более растений,

которые были трансформированы плазмидой, содержащей один или более наборов единиц транскрипции, обеспечивающих образование мицелл *in vivo*.

[0055] В дополнение к этому примеру, показанному на фиг. 2 в качестве варианта осуществления, промоторы в четырех наборах единиц транскрипции включают промоторы генов, кодирующих глицинин 1 сои, β -конглицинин 1 сои, глицинин 4 сои, ингибитор протеазы Боумена-Бирка сои, нопалинсинтазу агробактерий, глицинин 5 сои, соевый лектин и глицинин 3 сои. В целях ясности и краткости, промоторы генов, кодирующих глицинин 1 сои, показаны и обозначены в виде сокращения на фиг. 2 как GY1 ПРОМОТОР. Кроме того, в целях ясности и краткости, β -конглицинин 1 сои показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как CG1 промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости, глицинин 4 сои показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как GY4 промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости, промотор ингибитора протеазы Боумена-Бирка показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как D-II промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости, нопалинсинтаза агробактерий показана и обозначена в виде сокращения на фиг. 2 как NOS промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости, глицинин 5 сои показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как GY5 промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости соевый лектин показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как LE1 промотор. Кроме того, в целях ясности и краткости, глицинин 3 сои показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 2 как GY3 промотор.

[0056] Согласно другим вариантам осуществления и примерам промоторы в одном или более из четырех наборов единиц транскрипции включают промотор, способный инициировать транскрипцию в растительных клетках независимо от того, является ли источником промотора растительная клетка. Например, промоторы агробактерий функционируют в растительных клетках. Промоторы, способные инициировать транскрипцию в растительных клетках, включают промоторы, полученные из растений, растительных вирусов и бактерий, таких как агробактерии.

[0057] В качестве конкретных примеров промоторы, находящиеся под контролем развития, включают промоторы, которые предпочтительно инициируют транскрипцию в определенных тканях, таких как листья, корни или семена. Такие промоторы называют «тканепредпочтительными». Также в качестве конкретных примеров промоторы, инициирующие транскрипцию только в определенных тканях, называют «тканеспецифическими». Кроме того, в качестве конкретного примера, «специфический для типа клеток» промотор в первую очередь управляет экспрессией в определенных типах клеток в одном или более органах, например, сосудистых клетках в корнях или листьях. Согласно еще одному конкретному примеру, «индуцируемый» или «репрессируемый»

промотор представляет собой промотор, который находится под контролем окружающей среды. Примеры условий окружающей среды, которые могут влиять на транскрипцию с помощью индуцируемых или репрессируемых промоторов, включают анаэробные условия, определенные химические вещества или присутствие света. Тканепредпочтительные, тканеспецифические, специфические для типа клеток и индуцируемые или репрессируемые промоторы составляют класс «неконститутивных» промоторов. «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве условий.

[0058] Продолжая описание примера на фиг. 2 в качестве варианта осуществления, терминаторы транскрипции в четырех наборах единиц транскрипции включают терминирующую последовательность гена нопалинсинтазы, показанную и обозначенную в виде сокращения на фиг. 2 как NOS терминатор. Согласно другим вариантам осуществления терминаторы транскрипции в одном или более из четырех наборов единиц транскрипции включают терминаторы транскрипции из нативных генов глицинина сои или любые другие терминаторы транскрипции растений.

[0059] В этом примере в качестве варианта осуществления Т-ДНК, используемая для трансформации растения, также включает ДНК, кодирующую точку начала репликации, ген, придающий устойчивость к антибиотикам, правую пограничную последовательность Т-ДНК и левую пограничную последовательность Т-ДНК, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 2 как точка репликации рUC, устойчивость к ампициллину, RB и LB, соответственно. Согласно этому варианту осуществления ген, придающий устойчивость к антибиотикам, представляет собой ген, придающий устойчивость к антибиотику ампициллину. Согласно другим вариантам осуществления ген, придающий устойчивость к антибиотикам, представляет собой ген, придающий устойчивость к любому другому антибиотику, включая канамицин и хлорамфеникол.

[0060] На фиг. 3А показан пример с дополнительными детальными характеристиками от трансформации растения до посттрансляционной модификации. Трансформация растения и посттрансляционная модификация также описаны на фиг. 1. Пример, приведенный на фиг. 3А, также показывает образование рекомбинантного белка казеина, также описанное на фиг. 1. В качестве конкретного примера на фиг. 3А схематично изображена транскрипция белков казеинов из генов в TUS₁, а также посттранскрипционные изменения, которые происходят, когда белки движутся к своему специфическому субклеточному месту назначения, кодируемому общим сигнальным пептидом.

[0061] В примере, показанном на фиг. 3А, целью набора единиц транскрипции 1 является образование мицелл казеина *in vivo* согласно варианту осуществления. В этом примере трансформация растения показывает растение, трансформированное с

использованием Т-ДНК, включающей четыре набора единиц транскрипции, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 3А как 4-TUS плаزمид. Т-ДНК включает набор единиц транскрипции 1, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 3А как TUS₁, который включает одну единицу транскрипции для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицелле казеина, причем каждая единица транскрипции включает ДНК, кодирующую один и тот же сигнальный пептид растительного происхождения, промотор и терминатор транскрипции, как описано на фиг. 2. При транскрипции и трансляции TUS₁ в трансгенном растении в процессе образования рекомбинантного белка казеина в цитоплазме образуются четыре рекомбинантных белка казеина (α S₁-казеин, α S₂-казеин, β -казеин и κ -казеин), каждый из которых включает сигнальный пептид, который локализует рекомбинантный белок в конкретной ткани, например, в секреторном пути и вакуолях запаса белка в растительной клетке. В этом примере сигнальный пептид удаляется из рекомбинантных белков казеинов в ходе посттрансляционной модификации, которая происходит в эндоплазматическом ретикулеуме, сокращенно ER, растительной клетки.

[0062] Продолжая описание этого примера и варианта осуществления посттрансляционной модификации, фосфорилирование происходит на рекомбинантных белках казеина до, в ходе или после миграции в конкретную ткань. Фосфорилирование показано на фиг. 3А в виде кружков, окружающих букву «Р», которые добавляются к и затем присоединяются к каждому из рекомбинантных белков казеинов с образованием фосфорилированных белков казеинов. Затем фосфорилированные белки казеины локализуются в вакуоли, где происходит сборка *in vivo* мицелл. Согласно другим вариантам осуществления белки, кодируемые единицами транскрипции TUS₂ (не показаны), также являются фосфорилированными, гликозилированными или их комбинацией. Согласно другим вариантам осуществления не происходит посттрансляционных модификаций белков, кодируемых TUS₁, TUS₂, TUS₃ или TUS₄ (не показано). В качестве другого примера и варианта осуществления может быть необязательно включен ген киназы для создания белка киназы, который обеспечивает фосфорилирование белков казеинов, кодируемых единицами транскрипции TUS₄ (не показаны).

[0063] На фиг. 3В показан пример с дополнительными детальными характеристиками для образования *in vivo*. Образование *in vivo* также описано на фиг. 1. В качестве конкретного примера на фиг. 3В схематически изображено образование рекомбинантных мицелл *in vivo* внутри растительной клетки.

[0064] При локализации в вакуоли каждый из четырех рекомбинантных белков казеинов собирается с другими рекомбинантными белками казеинами с образованием

мицелл *in vivo*. В этом примере внешний слой мицеллы обогащен рекомбинантным κ -казеином, показанным и обозначенным в виде сокращения на фиг. 3В как κ , а внутренний матрикс мицеллы включает рекомбинантный αS_1 -казеин и αS_2 -казеин, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 3В как αS_1 и αS_2 , соответственно, и β -казеин, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 3В как β .

[0065] На фиг. 3С показан пример схематического изображения транскрипции белков, которые придают устойчивость к гербицидам трансформированному растению. На фиг. 3С показан пример назначения набора единиц транскрипции 2 в варианте осуществления.

[0066] В этом примере растение трансформируют с использованием Т-ДНК, включающей четыре набора единиц транскрипции, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 3С как 4-TUS плаزمиды. Т-ДНК включает набор единиц транскрипции 2, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 3С как TUS₂, который включает одну единицу транскрипции, которая включает ДНК, кодирующую фосфинотрицинацетилтрансферазу, которая придает устойчивость к гербицидам и позволяет проводить отбор трансформированных клеток, продуцирующих мицеллы, показанную и обозначенную в виде сокращения на фиг. 3С как АС-РТ, а также промотор и терминатор транскрипции (не показаны).

[0067] На фиг. 3D показан пример схематического изображения подавления нативных запасных белков семян с помощью интерферирующей РНК (РНКi), транскрибируемой частью плазмиды, показанной на фиг. 1. В качестве конкретного примера на фиг. 3D схематично изображено подавление нативных запасных белков семян с помощью РНКi, транскрибируемой одним или более генами в TUS₃.

[0068] На фиг. 3D показан пример назначения набора единиц транскрипции 3 согласно варианту осуществления. В этом примере растение трансформируют с использованием Т-ДНК, включающей четыре набора единиц транскрипции, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 3D как 4-TUS плазмиды. Т-ДНК включает набор единиц транскрипции 3, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 3D как TUS₃, который включает одну или более единиц транскрипции, которые приводят к нетранслируемым молекулам РНК, которые подавляют трансляцию генов нативных белков семян, тем самым высвобождая клеточные источники для продукции мицелл *in vivo*. Транскрипция ДНК в TUS₃ приводит к РНКi, показанной и обозначенной сокращенно на фиг. 3D как РНКi, которая нацелена на информационную РНК нативных растительных белков или нативных растительных пептидов, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 3D как мРНК НАТИВНЫЙ БЕЛОК, и подавляет экспрессию этих

информационных РНК посредством разрушения информационной РНК, так что рекомбинантные белки казеины, кодируемые TUS₁, описанные на фиг. 1, фиг. 3А и фиг. 3В, могут транслироваться в более высоких количествах, что приводит к более высоким концентрациям мицелл *in vivo* (не показано). Согласно некоторым вариантам осуществления ДНК, кодирующая РНК_i, функционально связана с конститутивным промотором или индуцируемым промотором (не показан), таким как, например, промотор нопалинсинтазы или α' -субъединица β -конглицинина сои, таким образом, что можно регулировать подавление трансляции генов нативного белка семян посредством РНК_i.

[0069] На фиг. 3Е и фиг. 3F показаны примеры схематических изображений транскрипции части плазмиды согласно фиг. 1, и полученных в результате белков, используемых для изменения внутриклеточных условий растительной клетки. В качестве конкретных примеров на фиг. 3Е и фиг. 3F схематично изображена транскрипция генов TUS₄ и полученные белки, используемые для изменения условий в цитоплазме клетки.

[0070] На фиг. 3Е показан пример назначения набора единиц транскрипции 4 согласно варианту осуществления. В этом примере растение трансформируют с использованием Т-ДНК, включающей четыре набора единиц транскрипции, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 3Е как 4-TUS плазида. Т-ДНК включает набор единиц транскрипции 4, показанный сокращенно на фиг. 3Е как TUS₄, который включает одну или более единиц транскрипции, кодирующих белки, повышающие концентрацию внутриклеточных минералов, включая кальций и фосфат. В этом примере TUS₄ включает одну единицу транскрипции, TU₄₋₁, которая включает промотор, ДНК, кодирующую оксалакдекарбоксилазу, и терминатор транскрипции (не показан). Транскрипция и трансляция TU₄₋₁ приводит к ферменту оксалакдекарбоксилазе, показанному и обозначенному в виде сокращения на фиг. 3Е как OD, который расщепляет оксалат кальция и повышает уровень кальция в растительной клетке. Повышенный внутриклеточный кальций усиливает образование мицелл рекомбинантного казеина в растительной клетке (не показано).

[0071] На фиг. 3F показан пример назначения набора единиц транскрипции 4 согласно варианту осуществления. В этом примере растение трансформируют с использованием Т-ДНК, включающей четыре набора единиц транскрипции, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 3F как 4-TUS плазида. Т-ДНК включает набор единиц транскрипции 4, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 3F как TUS₄, который включает одну или более единиц транскрипции, кодирующих белки, повышающие концентрацию внутриклеточных минералов, включая кальций и фосфат. В этом примере TUS₄ включает одну единицу транскрипции, TU₄₋₂, которая включает

промотор, ДНК, кодирующую фермент фитазу, и терминатор транскрипции (не показан). Транскрипция и трансляция TU₄₋₂ приводит к ферменту фитазе, показанному и обозначенному сокращенно на фиг. 3F как PE, который расщепляет фитиновую кислоту и повышает уровень фосфатов в растительной клетке. Повышенный уровень внутриклеточного фосфата усиливает образование мицелл рекомбинантного казеина в растительной клетке (не показано).

[0072] На фиг. 3G приведен пример дополнительных детальных характеристик образования *in vivo*. Образование *in vivo* также описано на фиг. 1, фиг. 3A и фиг. 3B. В качестве конкретного примера на фиг. 3G схематически изображено образование рекомбинантных мицелл *in vivo* внутри растительной клетки.

[0073] В примере, приведенном на фиг. 3G, показано образование рекомбинантных мицелл *in vivo* внутри растительной клетки, в которой четыре мицеллярных белка продуцируются путем транскрипции и трансляции набора единиц транскрипции 1, как показано и описано на фиг. 3A. Уровни кальция в вакуолях растительных клеток повышаются в присутствии оксалакдекарбоксилазы, продуцируемой посредством транскрипции и трансляции набора единиц транскрипции 4, как показано и описано на фиг. 3E. В этом примере четыре белка казеина, кодируемые единицей транскрипции 1, фосфорилируются и локализуются в вакуоли растительной клетки, где внутриклеточный кальций и внутриклеточный фосфат усиливают образование мицелл рекомбинантного казеина в вакуоли растительной клетки.

[0074] Аспекты настоящего изобретения могут быть дополнительно проиллюстрированы конкретным вариантом осуществления, в котором мицелла казеина собирается *in vivo* из составляющих ее белков в *Arabidopsis thaliana*, как дополнительно описано на фиг. 4 и фиг. 5.

[0075] На фиг. 4 приведен пример схематического изображения части плазмиды в *Arabidopsis*. Пример, показанный на фиг. 4, также описан на фиг. 2. В качестве конкретного примера на фиг. 4 схематически показаны элементы плазмид, которые кодируют белки мицеллярного компонента. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₁ в *Arabidopsis*.

[0076] Пример на фиг. 4 показывает набор единиц транскрипции, который можно использовать для создания мицелл казеина *in vivo* в *Arabidopsis thaliana*. Набор единиц транскрипции включает одну единицу транскрипции для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицелле казеина, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 4 как TU₁₋₁, TU₁₋₂, TU₁₋₃ и TU₁₋₄. Набор единиц транскрипции показан и сокращенно обозначен на фиг. 4 как TUS₁. Каждая из четырех единиц транскрипции

включает промотор, N-концевой сигнальный пептид растительного происхождения, ДНК, кодирующую один из четырех белков, обнаруживаемых в мицелле казеина, и терминатор транскрипции.

[0077] Продолжая описание этого примера, TU₁₋₁ включает двойной 35S промотор, содержащий лидерную последовательность омега вируса табачной мозаики (SEQ ID NO: 29), сигнальный пептид из гена CLV3 *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 27), кодирующую последовательность α S₁-казеин, кодон-оптимизированную для экспрессии в *Arabidopsis* с С-концевым пептидом HDEL для удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (SEQ ID NO: 5) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO: 35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 4 как 2X35S промотор + TMV Ω , сигнальный пептид, α S1 казеин и NOS терминатор, соответственно.

[0078] Продолжая описание этого примера, TU₁₋₂ включает короткий промотор 35S, содержащий усеченную версию промотора вируса мозаики цветной капусты и омега-лидерную последовательность вируса табачной мозаики (SEQ ID NO: 31), сигнальный пептид (SEQ ID NO: 27), кодирующую последовательность β -казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в *Arabidopsis* с С-концевым пептидом HDEL для удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (SEQ ID NO: 7), и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO: 35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 4 как 35S КОРОТКИЙ ПРОМОТОР + BTM Ω , СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, β -КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0079] Далее продолжая описание этого примера, TU₁₋₃ включает промотор маннопинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens* (SEQ ID NO: 32), сигнальный пептид (SEQ ID NO: 27), кодирующую последовательность κ -казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в *Arabidopsis* с С-концевым пептидом HDEL для удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (SEQ ID NO: 6) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO: 35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 4 как ПРОМОТОР МАННОПИНСИНТАЗЫ (*A. TUMEFACIENS*), СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, κ -КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0080] Далее продолжая описание этого примера, TU₁₋₄ включает промотор маннопинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens*, сигнальный пептид (SEQ ID NO: 32), кодирующую последовательность α S₂-казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в *Arabidopsis* с С-концевым пептидом HDEL для удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (SEQ ID NO:8) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 4 как ПРОМОТОР МАННОПИНСИНТАЗЫ (*A.*

TUMEFACIENS), СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, α S₂-КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0081] На фиг. 5 показан пример схематического изображения части плазмиды *Arabidopsis* в качестве маркера скрининга в растениях. В качестве конкретного примера на фиг. 5 схематически изображены элементы плазмид, которые обеспечивают маркер скрининга в растениях. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₂ в *Arabidopsis*.

[0082] Пример, приведенный на фиг. 5, показывает набор единиц транскрипции, который можно использовать для идентификации трансформированных растительных клеток. Набор единиц транскрипции, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 5 как TUS₂, включает одну единицу транскрипции, обозначенную показанную и обозначенную в виде сокращения на фиг. 5 как TU₂₋₁.

[0083] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 5 в качестве варианта осуществления, TU₂₋₁ включает конститутивный промотор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:28), кодирующую последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка, модифицированную для повышения яркости флуоресценции и кодон-оптимизированную для экспрессии в *Arabidopsis* (SEQ ID NO:33), и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 5 как NOS ПРОМОТОР, EGFP и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0084] В качестве конкретного примера, после стадий трансформации растения для создания мицелл казеина *in vivo* в *Arabidopsis thaliana*, плазида, включающая TUS₁ и TUS₂, может быть введена в семядоли *Arabidopsis thaliana* с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и способа транзientной экспрессии FAST. Проростки замачивают в растворе, содержащем агробактерии, через два дня после прорастания, что приводит к трансформации некоторых клеток семядолей. Трансформированные клетки *Arabidopsis* могут быть идентифицированы как содержащие Т-ДНК путем наблюдения за флуоресценцией, проявляемой усиленным зеленым флуоресцентным белком. Успешно трансформированные клетки *Arabidopsis* проявляют зеленую флуоресценцию, в то время как неудачно трансформированные клетки практически не проявляют зеленую флуоресценцию.

[0085] Кроме того, в качестве конкретного примера образования мицелл *in vivo* в *Arabidopsis thaliana* в качестве варианта осуществления можно использовать способы мечення иммунозолотом для определения местоположения и морфологии мицелл казеина, образующихся *in vivo*. В этом примере образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления зародышевая ткань может быть получена из *Arabidopsis thaliana*, который

был трансформирован плазмидой, включающей TUS₁ и необязательно TUS₂, как показано на фиг. 4 и фиг. 5, соответственно. Зародышевую ткань можно обработать казеин-специфическими антителами с использованием способов мечения иммунозолотом и визуализировать с помощью просвечивающей электронной микроскопии для определения местоположения и морфологии мицелл, образующихся *in vivo*. В ткани, полученной из трансформированного *Arabidopsis thaliana*, мицеллы казеина визуализируются как меченые золотом-антителами субклеточные структуры размером в диапазоне от 50 до 600 нм, что аналогично размеру мицелл казеина крупного рогатого скота. В качестве контроля мицеллы казеина не визуализируются с использованием способов мечения иммунозолотом в ткани, полученной из нетрансформированного *Arabidopsis thaliana*.

[0086] Продолжая описание этого конкретного примера образования мицелл *in vivo* у *Arabidopsis thaliana* в качестве варианта осуществления, экстракцию белка и анализ высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) можно использовать для оценки белкового состава мицелл казеина, образующихся *in vivo*. В этом примере образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления зародышевая ткань может быть получена из *Arabidopsis thaliana*, который был трансформирован плазмидой, включающей TUS₁ и необязательно TUS₂, как показано на фиг. 4 и фиг. 5, соответственно. Белки, экстрагированные из зародышевой ткани, можно разделить с помощью ВЭЖХ и обнаружить по поглощению в ультрафиолетовом диапазоне. Белки, экстрагированные из трансформированной ткани *Arabidopsis thaliana* и подвергнутые анализу ВЭЖХ, показывают пики, связанные с каждым из четырех белков, обнаруживаемых в мицелле казеина, включая α S₁ казеин, α S₂ казеин, β казеин и κ казеин, которые демонстрируют время удерживания, подобное тем, о которых сообщили Bordin et al. для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицеллах казеина крупного рогатого скота. В качестве контроля белки, извлеченные из нетрансформированной ткани *Arabidopsis thaliana* и подвергнутые анализу ВЭЖХ, не показали пики, связанные с каким-либо из четырех белков казеинов.

[0087] Продолжая описание этого конкретного примера образования мицелл *in vivo* в *Arabidopsis thaliana* в качестве варианта осуществления, количество каждого белка казеина, обнаруживаемого в мицеллах, образованных *in vivo*, можно количественно определить путем измерения площади под пиками, полученными при анализе ВЭЖХ. Количественная оценка пиков, полученных при анализе ВЭЖХ белков, экстрагированных из трансформированного *Arabidopsis thaliana*, дает измерения, показывающие, что α S₁ казеин является наиболее распространенным, за ним следует β казеин в качестве следующего наиболее распространенного, затем α S₂ казеин и κ казеин в качестве наименее

распространенных белков казеинов, что коррелирует с относительным содержанием каждого из четырех белков казеинов в мицеллах казеина крупного рогатого скота, как ранее сообщалось в the Handbook of Dairy Foods and Nutrition, Таблица 1.1.

[0088] Аспекты настоящего изобретения могут быть дополнительно проиллюстрированы конкретным вариантом осуществления, в котором мицелла казеина собирается *in vivo* из составляющих ее белков в растении сои, и дополнительно описаны на фиг. 6 по фиг. 9.

[0089] На фиг. 6 показан пример схематического изображения части плазмиды в растении сои. В качестве конкретного примера на фиг. 6 схематично показаны элементы плазмид, которые кодируют белки мицеллярного компонента. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₁ в растении сои.

[0090] В этом примере на фиг. 6 изображен набор единиц транскрипции, который можно использовать для создания мицелл казеина *in vivo* в растении сои. Набор единиц транскрипции включает одну единицу транскрипции для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицелле казеина, показанных и обозначенных в виде сокращения на фиг. 4 как TU₁₋₁, TU₁₋₂, TU₁₋₃ и TU₁₋₄. Первый набор единиц транскрипции показан и обозначен в виде сокращения на фиг. 6 как TUS₁. Каждая из четырех единиц транскрипции включает промотор, N-концевой сигнальный пептид растительного происхождения, ДНК, кодирующую один из четырех белков, обнаруживаемых в мицелле казеина, и терминатор транскрипции.

[0091] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 6 в качестве варианта осуществления, TU₁₋₁ включает промотор из гена глицинина GY1 сои (SEQ ID NO:13), сигнальный пептид (SEQ ID NO:26), кодирующую последовательность αS₁ казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:1), и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 6 как GY1 ПРОМОТОР, СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, αS₁ КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0092] Далее продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 6 в качестве варианта осуществления, TU₁₋₂ включает промотор из гена CG1 сои (SEQ ID NO:14), сигнальный пептид (SEQ ID NO:26), кодирующую последовательность β казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:3), и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 6 как CG1 ПРОМОТОР, СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, β-КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0093] Далее продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 6 в качестве варианта осуществления, TU₁₋₃ включает промотор из гена глицинина GY4 (SEQ ID NO:15), сигнальный пептид (SEQ ID NO:26), кодирующую последовательность к казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:2) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 6 как GY4 ПРОМОТОР, СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, к-КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0094] Далее продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 6 в качестве варианта осуществления, TU₁₋₄ включает промотор из гена ингибитора протеиназы Боумена-Бирка D-II сои (SEQ ID NO:16), сигнальный пептид (SEQ ID NO:26), кодирующую последовательность α S₂ казеина, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:4) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 6 как D-II ПРОМОТОР, СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД, α S₂ КАЗЕИН и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0095] На фиг. 7 показан пример схематического изображения части плазмиды сои для устойчивости растений к гербицидам. В качестве конкретного примера на фиг. 7 схематически показаны элементы плазмид, которые обеспечивают устойчивость растений к гербицидам. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₂ в растении сои.

[0096] На фиг. 7 приведен пример части трансформации растения, который показывает набор единиц транскрипции, который можно использовать для отбора клеток растения, которые были трансформированы. Набор единиц транскрипции, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 7 как TUS₂, включает одну единицу транскрипции, показанную и обозначенную в виде сокращения на фиг. 7 как TU₂₋₁.

[0097] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 7 в качестве варианта осуществления, TU₂₋₁ включает промотор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:28), кодирующую последовательность фосфинотрицинацетилтрансферазы, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои (SEQ ID NO:34), которая придает устойчивость к гербициду глюфосинату, и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 7 как NOS ПРОМОТОР, ФОСФИНОТРИЦИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗА и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0098] На фиг. 8 приведен пример схематического изображения части плазмиды в растении сои для подавления нативных запасных белков семян в растениях. В качестве

конкретного примера на фиг. 8 схематично показаны элементы плазмид, которые обеспечивают подавление нативных запасных белков семян в растениях. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₃ в растении сои.

[0099] На фиг. 8 приведен пример части трансформации растения, который показывает набор единиц транскрипции, который можно использовать для усиления образования мицелл казеина *in vivo* в растении сои. Третий набор единиц транскрипции, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 8 как TUS₃, включает две единицы транскрипции, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 8 как TU₃₋₁ и TU₃₋₂. Транскрипция TU₃₋₁ и TU₃₋₂ продуцирует РНК со структурой шпильки, в которой плечи гомологичны части нативного гена сои или семейства генов и достаточны для подавления этих нативных генов или семейств генов (не показано).

[0100] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 8 в качестве варианта осуществления, TU₃₋₁ включает промотор из гена глицинина GY4 сои (SEQ ID NO:15), часть последовательности, кодирующей глицинин GY1 сои, в которой отсутствует стартовый кодон и которая является высоко гомологичной среди семейства генов глицинина (SEQ ID NO:24), интрон IV2 картофеля (SEQ ID NO:25), антисмысловую последовательность глицинина GY1 сои (SEQ ID NO:17) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 8 как GY4 ПРОМОТОР, СМЫСЛОВАЯ GY1, ИНТРОН IV2, АНТИСМЫСЛОВАЯ GY1 и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0101] Далее продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 8 в качестве варианта осуществления, TU₃₋₂ включает промотор из гена глицинина GY5 сои (SEQ ID NO:18), часть последовательности, кодирующей β-конглицинин 1 сои, в которой отсутствует стартовый кодон и которая является высоко гомологичной среди семейства генов β-конглицинина (SEQ ID NO:19), интрон IV2 картофеля (SEQ ID NO:25), антисмысловую последовательность β-конглицинина 1 сои (SEQ ID NO:20) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 8 как GY5 ПРОМОТОР, СМЫСЛОВАЯ CG1, ИНТРОН IV2, АНТИСМЫСЛОВАЯ CG1 и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0102] На фиг. 9 показан пример схематического изображения части плазмиды сои для регулирования цитоплазматических концентраций минералов, которые могут усиливать образование мицелл. В качестве конкретного примера на фиг. 9 схематически показаны элементы плазмид, которые регулируют цитоплазматическую концентрацию

минералов, которые могут усиливать образование мицелл. Изображенные единицы транскрипции являются компонентами TUS₄ в растении сои.

[0103] На фиг. 9 приведен пример части трансформации растения, который показывает набор единиц транскрипции, который можно использовать для усиления образования мицелл казеина *in vivo* в растении сои. Четвертый набор единиц транскрипции, показанный и обозначенный в виде сокращения на фиг. 9 как TUS₄, включает две единицы транскрипции, показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 9 как TU₄₋₁ и TU₄₋₂. Белки, кодируемые TU₄₋₁ и TU₄₋₂, изменяют внутриклеточную среду таким образом, что оптимизируют образование мицелл *in vivo*.

[0104] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 9 в качестве варианта осуществления, TU₄₋₁ включает промотор из гена LE1 сои (SEQ ID NO:23), кодирующую последовательность оксалаатдекарбоксилазы из *Flammulina velutipes*, кодон-оптимизированную для экспрессии в растении сои, (SEQ ID NO:12) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 9 как LE1 ПРОМОТОР, ОКСАЛАТДЕКАРБОКСИЛАЗА CDS и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0105] Продолжая описание этого примера для части трансформации растения, как показано на фиг. 9 в качестве варианта осуществления, TU₄₋₂ включает промотор глицинина GY3 (SEQ ID NO:30), кодирующую последовательность фермента фитазы сои (SEQ ID NO:11) и терминатор нопалинсинтазы (SEQ ID NO:35), показанные и обозначенные в виде сокращения на фиг. 9 как GY3 ПРОМОТОР, ФИТАЗА и NOS ТЕРМИНАТОР, соответственно.

[0106] В этом примере после стадий трансформации растения для создания мицелл казеина *in vivo* в растении сои, плазида, включающая TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и необязательно TUS₄, как показано на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно, может быть введена в каллус сои с использованием стандартных способов биолистической трансформации. Трансформированные растения сои могут быть отобраны на среде, содержащей гербицид глюфосинат, и геномы трансформированных растений сои могут быть проверены на вставку плазмиды с использованием стандартных способов картирования ПЦР. Трансформированные растения сои, включающие TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и необязательно TUS₄ в своем геноме, можно переносить в теплицу для получения семян.

[0107] В примере образования мицелл *in vivo* каллус сои в качестве варианта осуществления можно использовать способы мечения иммунозолотом для определения местоположения и морфологии мицелл казеина, образующихся *in vivo*. Что касается этого

примера образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления, ткань может быть получена из растений сои, которые были трансформированы плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и необязательно TUS₄, как показано на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно. Ткань можно обработать казеин-специфическими антителами с использованием стандартных способов мечения иммунозолотом и визуализировать с помощью просвечивающей электронной микроскопии для определения местоположения и морфологии мицелл, образующихся *in vivo*. В ткани, полученной из трансформированных растений сои, мицеллы казеина визуализируются как меченые золотом-антителами субклеточные структуры размером в диапазоне от 50 до 600 нм, что аналогично размеру мицелл казеина крупного рогатого скота. В качестве контроля мицеллы казеина не визуализируются с использованием способов мечения иммунозолотом в ткани, полученной из нетрансформированных растений сои.

[0108] Продолжая описание этого примера образования мицелл *in vivo* в растении сои в качестве варианта осуществления, можно использовать экстракцию белка и анализ электрофореза в полиакриламидном геле для оценки белкового состава мицелл казеина, образующихся *in vivo*. В этом примере образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления ткань может быть получена из растений сои, которые были трансформированы плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и необязательно TUS₄, как показано на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно. Белки, экстрагированные из трансформированной ткани растения сои и подвергнутые анализу электрофореза в полиакриламидном геле, показывают полосы на полиакриламидном геле, соответствующие по размеру каждому из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицелле казеина, включая α S₁ казеин, α S₂ казеин, β казеин и κ казеин. В качестве контроля белки, экстрагированные из нетрансформированной ткани растения сои и подвергнутые анализу электрофореза в полиакриламидном геле, не показывают полос на полиакриламидном геле, соответствующих четырем белкам казеинам.

[0109] Продолжая этот пример образования мицелл *in vivo* в растении сои в качестве варианта осуществления, экстракцию белка и анализ ВЭЖХ можно использовать для оценки белкового состава мицелл казеина, образующихся *in vivo*. В этом примере образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления ткань может быть получена из растений сои, которые были трансформированы плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и необязательно TUS₄, как показано на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно. Белки, экстрагированные из трансформированной ткани растения сои, можно разделить с помощью ВЭЖХ и определить по поглощению в ультрафиолетовом диапазоне. Белки, экстрагированные из трансформированной ткани растения сои и

подвергнутые анализу ВЭЖХ, показывают пики, связанные с каждым из четырех белков, обнаруживаемых в мицелле казеина, включая αS_1 казеин, αS_2 казеин, β казеин и κ казеин, которые демонстрируют время удерживания, подобное указанным Bordin et al. для каждого из четырех белков казеинов, обнаруживаемых в мицеллах казеина крупного рогатого скота. В качестве контроля белки, экстрагированные из нетрансформированной ткани растения сои и подвергнутые анализу ВЭЖХ, не показывают пики, связанные с четырьмя белками казеинами.

[0110] Продолжая этот пример образования мицелл в растении сои *in vivo* в качестве варианта осуществления, количество каждого белка казеина, обнаруживаемого в мицеллах, образованных *in vivo*, можно количественно определить путем измерения площади под пиками, полученными при анализе ВЭЖХ. Количественная оценка пиков, полученных при анализе ВЭЖХ белков, экстрагированных из трансформированной ткани растения сои, дает измерения, показывающие, что αS_1 казеин является наиболее распространенным, за ним следует β казеин в качестве следующего наиболее распространенного, αS_2 казеин и κ казеин в качестве наименее распространенных белков казеинов, что коррелирует с относительным содержанием каждого из четырех белков казеинов в мицеллах казеина крупного рогатого скота, как ранее сообщалось в the Handbook of Dairy Foods and Nutrition, Таблица 1.1.

[0111] Продолжая этот пример образования мицелл в растении сои *in vivo* в качестве варианта осуществления, анализ РНК можно использовать для оценки подавления нативных генов семян сои в ходе образования мицелл казеина *in vivo*. В этом примере образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления растения сои, трансформированные плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂, TUS₃ и необязательно TUS₄, показанные на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно, можно выращивать до стадии цветения в теплице, а зародыши сои удалять из цветущих семенных коробочек на 35-й день с использованием стандартных способов вскрытия. Уровни экспрессии нативных генов семян сои можно анализировать с использованием стандартных способов выделения и секвенирования РНК. Анализ РНК зародышей трансформированных растений сои показывает по меньшей мере 10% снижение экспрессии одного или более нативных генов семян сои, включая гены семейства глицининов (Glyma.03g163500, Glyma.19g164900, Glyma.10g037100, Glyma.13g123500, Glyma.19g164800) и гены семейства β -конглицининов (Glyma.10g246300, Glyma.20g148400, Glyma.20g148300, Glyma.20g146200, Glyma.20g148200, Glyma.10g246500, Glyma.10g028300, Glyma.02g145700). В качестве контроля анализ РНК зародышей нетрансформированных растений сои не показывает снижения экспрессии нативных генов семян сои.

[0112] Продолжая этот пример образования мицелл в растении сои *in vivo* в качестве варианта осуществления, можно использовать коммерчески доступные анализы и рентгенофлуоресцентные способы для оценки уровней оксалата кальция в ходе образования мицелл казеина *in vivo*. Что касается этого примера образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления, растения сои, которые были трансформированы плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и TUS₄, показанные на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно, можно выращивать до стадии цветения в теплице, а зародыши сои удалять из цветущих семенных коробочек на 27-й день с использованием стандартных способов вскрытия. Концентрация оксалата может быть измерена с использованием коммерчески доступных анализов, а концентрация кальция может быть измерена с помощью рентгеновской флуоресценции. Зародыши из трансформированных растений сои демонстрируют снижение концентрации оксалатов на по меньшей мере 5% и повышение концентрации кальция на по меньшей мере 4% по сравнению с контрольными зародышами нетрансформированных растений сои, что указывает на то, что зародыши трансформированных растений сои имеют на по меньшей мере 4% больше доступного кальция по сравнению с зародышами нетрансформированных растений сои.

[0113] Продолжая описание этого примера образования мицелл *in vivo* в растении сои в качестве варианта осуществления, можно использовать коммерчески доступные анализы оценки уровней фосфатов в ходе образования мицелл казеина *in vivo*. Что касается этого примера образования мицелл *in vivo* в качестве варианта осуществления, растения сои, которые были трансформированы плазмидой, включающей TUS₁, TUS₂ и необязательно TUS₃ и TUS₄, показанные на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно, можно выращивать до стадии цветения в теплице, а зародыши сои удалять из цветущих семенных коробочек на 27-й день с использованием стандартных способов вскрытия. Зародыши можно измельчать с помощью ступки и пестика, обработать ультразвуком и центрифугировать с получением надосадочной жидкости, которую можно проверить на уровень фосфатазы с использованием имеющихся в продаже анализов. Зародыши трансформированных растений сои показывают по меньшей мере 5% увеличение уровней фосфатазы по сравнению с контрольными зародышами нетрансформированных растений сои, что указывает на то, что зародыши трансформированных растений сои имеют на по меньшей мере 5% больше доступного фосфата по сравнению с зародышами нетрансформированных растений сои.

[0114] Аспекты настоящего изобретения могут быть дополнительно проиллюстрированы конкретным вариантом осуществления, в котором мицеллы, полученные *in vivo*, очищают, как дополнительно описано на фиг. 10.

[0115] На фиг. 10 показан пример процесса очистки мицелл, образующихся *in vivo* в растении сои. Кроме того, процесс на фиг. 10 представляет собой пример выделения рекомбинантной мицеллы. Кроме того, в этом примере на фиг. 10 показан процесс, в котором мицеллы казеина, полученные из сои, очищают от растительной ткани таким образом, чтобы мицеллы оставались функциональными после очистки. Исходным материалом для процесса очистки являются высушенные соевые бобы, собранные с растений, которые были трансформированы плазмидой, содержащей все четыре набора единиц транскрипции, TUS₁, TUS₂, TUS₃ и TUS₄, описанные на фиг. 6, фиг. 7, фиг. 8 и фиг. 9, соответственно. Исходный материал для процесса очистки показан на фиг. 10 и изображен в виде прямоугольника, окружающего слово «СОЯ».

[0116] Продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, шелуху удаляют из высушенных соевых бобов в ходе ряда стадий, включающего очистку, растрескивание и аспирацию, как показано на фиг. 10 и изображено в виде прямоугольников, заключающих в себе слова «ОЧИСТКА», «РАСТРЕСКИВАНИЕ» и «АСПИРАЦИЯ». Согласно этому варианту осуществления оболочки не содержат полезных количеств мицелл казеина и их выбрасывают, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, заключающий в себе слово «ОБОЛОЧКИ».

[0117] Продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, оставшийся материал расслаивают с получением хлопьев для увеличения площади поверхности и обеспечения более быстрой инфильтрации воды или растворителя. Полученный материал в виде хлопьев показан на фиг. 10 и изображен в виде прямоугольника с надписью «ПОЛНОЖИРНЫЕ ХЛОПЬЯ».

[0118] Далее продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, материал в виде хлопьев затем обезжиривают гексаном с использованием стандартного оборудования для обезжиривания и способов экстракции растворителем, как показано на фиг. 10 и изображено в виде прямоугольника, включающего слова «ЭКСТРАКЦИЯ РАСТВОРИТЕЛЕМ». Обезжиривание можно проводить с использованием любого стандартного растворителя на основе гексана с последующим удалением растворителя с использованием флэш-процесса или процесса на основе пара. Образовавшееся масло удаляют, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «НЕОЧИЩЕННОЕ МАСЛО», оставляя обезжиренные хлопья, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «ОБЕЗЖИРЕННЫЕ ХЛОПЬЯ СОИ».

[0119] Далее продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, обезжиренные хлопья затем смешивают с водой и влажным помолом, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «ВЛАЖНОЕ ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ В H₂O». В процессе измельчения обезжиренные хлопья измельчают в порошок, что высвобождает мицеллы казеина и позволяет мицеллам контактировать с водной средой. В дополнение к процессу измельчения обезжиренные хлопья также энергично встряхивают для того, чтобы способствовать высвобождению мицелл казеина в воду, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слово «ВСТРЯХИВАНИЕ». Процесс измельчения и энергичное встряхивание обезжиренных хлопьев приводит к суспензии, где соевый материал был тонко измельчен, и многие мицеллы казеина были высвобождены в суспензию в воде (не показано). Кроме того, многие другие белки и углеводы также растворены в воде (не показано). Согласно некоторым вариантам осуществления влажный помол осуществляют с использованием перфорированных дисковых или коллоидных мельниц непрерывного потока.

[0120] Далее продолжая описание этого примера очистки мицелл, образовавшихся *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, суспензию подают через ряд сетчатых сит для удаления более крупных частиц из мицелл казеина, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слово «ФИЛЬТРАЦИЯ». Согласно этому варианту осуществления суспензию сначала пропускают через сито с отверстиями сита 5 мм (не показано), а затем пропускают через сито с отверстием сита 0,5 мм (не показано). Материал, захваченный ситами, выбрасывают, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «ОРГАНИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ».

[0121] Продолжая описание этого примера очистки мицелл, образовавшихся *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, оставшийся материал в суспензии, прошедший через оба сита, затем подвергают ультразвуковой обработке для разрушения агрегатов мицелл казеина таким образом, чтобы большинство мицелл не контактировали с другими мицеллами, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слово «ОБРАБОТКА УЛЬТРАЗВУКОМ». Согласно некоторым вариантам осуществления обработку ультразвуком с непрерывным потоком с использованием нескольких ультразвуковых устройств параллельно используют для максимизации скорости потока.

[0122] Продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, после обработки ультразвуком суспензию пропускают через устройство микрофльтрации с размером пор 2 мкм для удаления более крупных частиц, при этом позволяя мицеллам казеина проходить, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слово «МИКРОФИЛЬТРАЦИЯ». Материал, захваченный блоком микрофльтрации, выбрасывают, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «КРУПНЫЕ ЧАСТИЦЫ». Оставшийся материал, который прошел через блок микрофльтрации, в основном состоит из мицелл казеина, а также растворенных белков, солей и углеводов (не показаны).

[0123] Далее продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, материал, который прошел через блок микрофльтрации, затем обрабатывают в блоке ультрафльтрации, который позволяет проходить растворенным молекулам диаметром менее 100 нм, удерживая при этом мицеллы казеина, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ». Согласно некоторым вариантам осуществления ультрафльтрацию с непрерывным потоком с несколькими параллельными фильтрами используют для максимизации скоростей потока. Растворимые белки, соли и минералы, прошедшие через блок ультрафльтрации, выбрасывают, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «РАСТВОРЕННЫЕ БЕЛКИ, СОЛИ, МИНЕРАЛЫ».

[0124] Далее продолжая описание этого примера очистки мицелл, образованных *in vivo* в растении сои, в качестве варианта осуществления, конечным продуктом этого процесса является водная жидкость, где наиболее распространенным компонентом после воды являются мицеллы казеина, как показано на фиг. 10 и изображено в виде стрелки, указывающей на прямоугольник, включающий слова «КОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ МИЦЕЛЛЫ». Эти мицеллы (не показаны) сохраняют свою форму и функцию, поэтому их можно использовать в последующих процессах, таких как производство синтетического молока или сыра.

[0125] В качестве дополнительных примеров для фиг. 10 способ выделения рекомбинантных мицелл из семян производственного растения может предусматривать очистку и обдирание или лущение семян, расслаивание очищенных семян до толщины 0,005–0,02 дюйма, экстракцию масла из хлопьев растворителем, удаление растворителя из хлопьев без тепловой обработки и сбор обезжиренных, очищенных хлопьев, отделение мицелл в водную суспензию путем гидратации, встряхивание и влажное измельчение

хлопьев, пропускание суспензии через ряд сетчатых сит для удаления частиц размером более 0,5 мм и сбор пермеата, ультразвуковую обработку пермеата с предыдущей стадии, микрофильтрацию продукта с предыдущей стадии с удалением частиц размером более 2 мкм, ультрафильтрацию пермеата с предыдущей стадии с использованием устройства, которое позволяет частицам диаметром > 100 нм проходить в пермеате ультрафильтрации, сбор ретентата с предыдущей стадии, который содержит концентрированные рекомбинантные мицеллы.

[0126] Продолжая описание этого примера, способ выделения рекомбинантных мицелл из семян дополнительно предусматривает центрифугирование ретентата с предыдущей стадии для отделения мицелл от остатка ретентата. Также способ продолжается от стадии ультрафильтрации до пропускания суспензии через устройство для ультрафильтрации и сбора пермеата, содержащего белок и другие молекулы, и ретентата, содержащего мицеллы, и последующего добавления диафильтрационной жидкости к ретентату по существу с той же скоростью, с которой пермеат собирают, и пропускания указанного ретентата через устройство для ультрафильтрации. Кроме того, способ предусматривает измельчение семени по меньшей мере одного растения, выбранного из группы растений, состоящей из кукурузы, риса, сорго, вигны, сои, маниоки, таро, кунжута, арахиса, гороха, хлопка и ямса.

[0127] Полученные в результате способ, процесс, аппарат, устройство, продукт и система являются экономически эффективными, высоко универсальными и точными и могут быть реализованы путем адаптации компонентов для готового, эффективного и экономичного производства, применения, получения и использования. Другой важный аспект варианта осуществления настоящего изобретения состоит в том, что он ценным образом поддерживает и обеспечивает историческую тенденцию к снижению затрат, упрощению систем и увеличению выхода продукта.

[0128] Эти и другие ценные аспекты вариантов осуществления настоящего изобретения, следовательно, выводят состояние технологии по меньшей мере на следующий уровень. Хотя раскрытие было описано в связи с конкретным наилучшим вариантом, следует понимать, что многие альтернативы, модификации и вариации очевидны специалистам в данной области техники в свете приведенных в настоящем документе описаний. Соответственно, предполагается, что настоящее изобретение охватывает все такие альтернативы, модификации и вариации, которые входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Все раскрытия, изложенные в настоящем документе или показанные на прилагаемых чертежах, следует интерпретировать в иллюстративном и неограничивающем смысле.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сборки *in vivo* рекомбинантной мицеллы, предусматривающий:
введение плазмиды в растительную клетку, где:

плазмида включает сегмент дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для кодирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) белка в мицелле казеина,

сегмент ДНК транскрибируется и транслируется,

образование рекомбинантных белков казеинов в растительной клетке, где:

рекомбинантные белки казеины включают κ -казеин и по меньшей мере один из α S1-казеина, α S2-казеина, β -казеина, и

сборку *in vivo* рекомбинантной мицеллы внутри растительной клетки, где:

внешний слой рекомбинантной мицеллы обогащен κ -казеином,

внутренний матрикс рекомбинантной мицеллы включает по меньшей мере один из α S1-казеина, α S2-казеина, β -казеина.

2. Способ по п. 1, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий N-концевой сигнальный пептид, который нацеливает рекомбинантные белки казеины на вакуоль в растительной клетке.

3. Способ по п. 1, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий маркер отбора или маркер скрининга.

4. Способ по п. 1, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий интерферирующую РНК для подавления экспрессии нативного белка или нативного пептида в растительной клетке.

5. Способ по п. 1, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий белок, способный изменять внутриклеточную среду растительной клетки.

6. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий:

введение дополнительной плазмиды в растительную клетку,

где:

дополнительная плазмида включает дополнительный сегмент ДНК для кодирования дополнительной РНК дополнительного белка в мицелле казеина,

дополнительный сегмент ДНК транскрибируется и транслируется, и

дополнительный сегмент ДНК представляет собой по меньшей мере один из кодирующего:

N-концевой сигнальный пептид, который нацеливает рекомбинантные белки казеины на эндоплазматический ретикулум в растительной клетке,

дополнительный N-концевой сигнальный пептид, который нацеливает рекомбинантные белки казеины на вакуоль в растительной клетке,

маркер отбора или маркер скрининга,

белок, способный изменять внутриклеточную среду растительной клетки.

7. Способ по п. 1, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, включающий одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:8.

8. Рекомбинантная мицелла, содержащая:

внешний слой, обогащенный κ -казеином, и

внутренний матрикс, включающий по меньшей мере один из α S1-казеина, α S2-казеина, β -казеина.

9. Рекомбинантная мицелла по п. 8, где внутренний матрикс включает кальций и фосфат.

10. Плазмида, содержащая сегмент дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для кодирования белка в мицелле казеина, где сегмент ДНК включает промотор и N-концевой сигнальный пептид.

11. Плазмида по п. 10, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий N-концевой сигнальный пептид, который нацеливает рекомбинантные белки казеины на вакуоль в растительной клетке.

12. Плазмида по п. 10, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий маркер отбора или маркер скрининга

13. Плазмида по п. 10, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий интерферирующую РНК для подавления экспрессии нативного белка или нативного пептида в растительной клетке.

14. Плазмида по п. 10, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, кодирующий белок, способный изменять внутриклеточную среду растительной клетки.

15. Плазмида по п. 10, где плазмида включает дополнительный сегмент ДНК, включающий одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:8.

16. Способ выделения рекомбинантной мицеллы, предусматривающий:

обработку семени, включающего цитоплазм с рекомбинантной мицеллой,

микрофльтрацию цитоплазма с удалением частиц с размером более 2 мкм,

ультрафльтрацию цитоплазмы, подвергнутой микрофльтрации, до дальнейшего размера частиц более 100 нм, и

сбор рекомбинантной мицеллы из цитоплазмы, подвергнутой ультрафльтрации.

17. Способ по п. 16, в котором:

обработка семени включает:

очистку и обдирание или лушение семени,

расслаивание очищенного семени на хлопья толщиной 0,005 – 0,02 дюйма,

экстракцию растворителем масла из хлопьев семени,

удаление растворителя из хлопьев семени без тепловой обработки и сбор обезжиренных, очищенных хлопьев,

отделение рекомбинантной мицеллы в суспензию путем гидратации, встряхивание и влажное измельчение хлопьев семян,

пропускание суспензии через сетчатое сито с удалением частиц размером более 0,5 мм и сбор пермеата, и

микрофльтрация цитоплазма включает микрофльтрацию пермеата.

18. Способ по п. 16, в котором:

микрофльтрация цитоплазма включает микрофльтрацию пермеата,

ультрафльтрация цитоплазмы, подвергнутой микрофльтрации, включает ультрафльтрацию пермеата, подвергнутого микрофльтрации, и

сбор рекомбинантной мицеллы из цитоплазмы, подвергнутой ультрафльтрации, включает сбор ретентата из пермеата, подвергнутого ультрафльтрации.

19. Способ по п. 16, в котором:

микрофльтрация цитоплазмы включает микрофльтрацию пермеата,

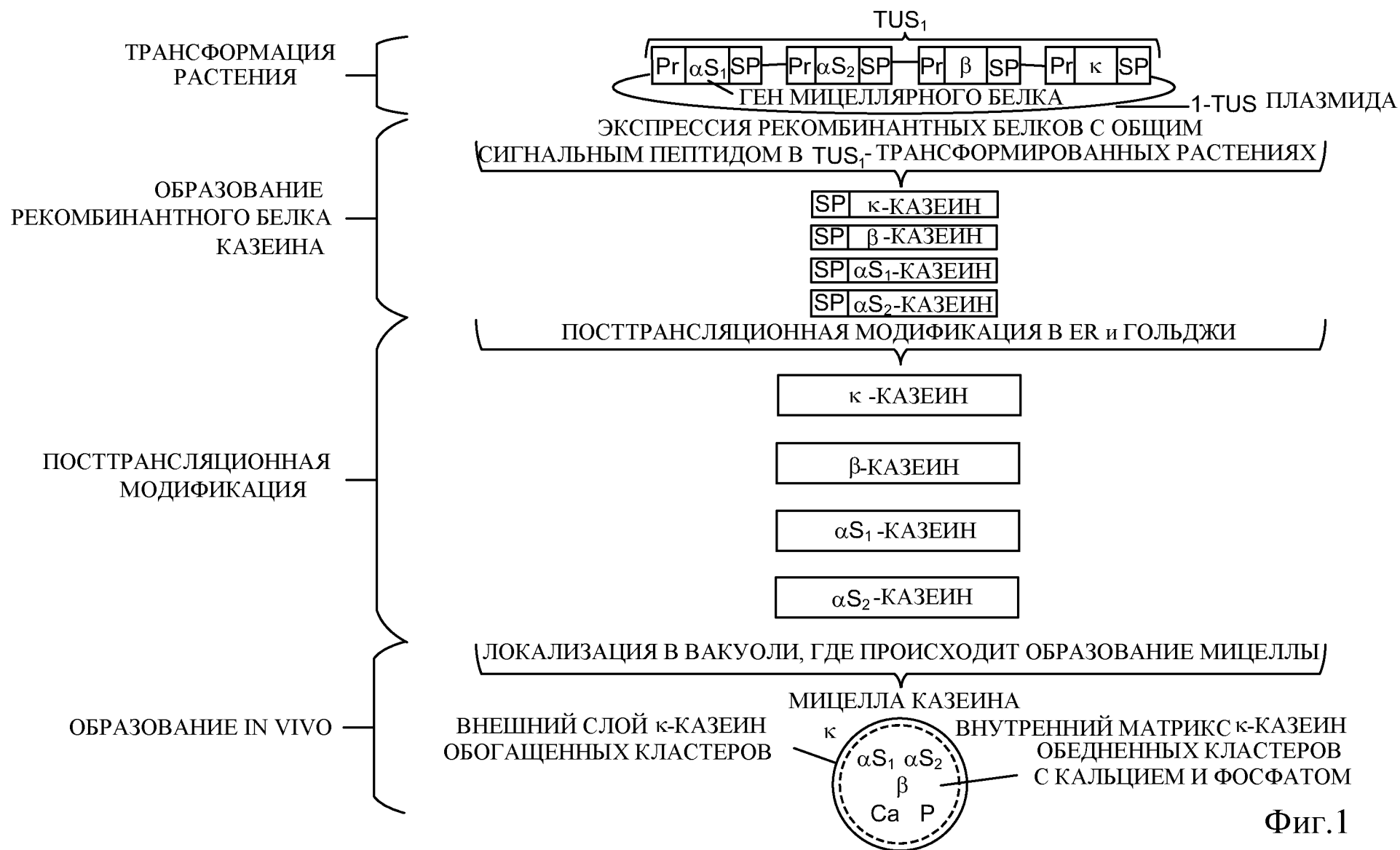
ультрафльтрация цитоплазмы, подвергнутой микрофльтрации, включает ультрафльтрацию пермеата, подвергнутого микрофльтрации,

сбор рекомбинантной мицеллы из цитоплазмы, подвергнутой ультрафльтрации, включает сбор ретентата из пермеата, подвергнутого ультрафльтрации, и

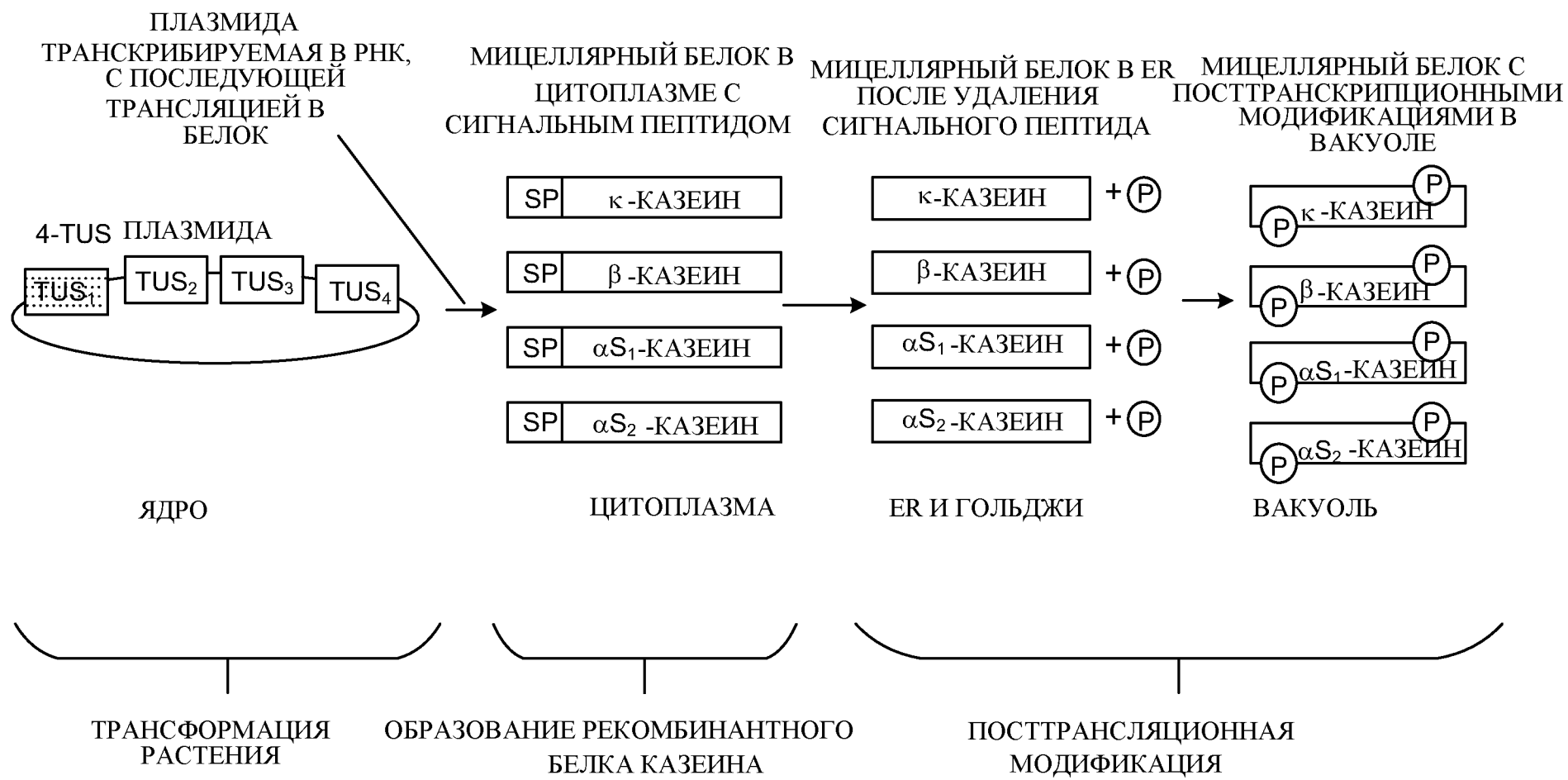
который дополнительно предусматривает:

диафльтрацию ретентата со скоростью сбора пермеата и пропускание ретентата через ультрафльтрацию.

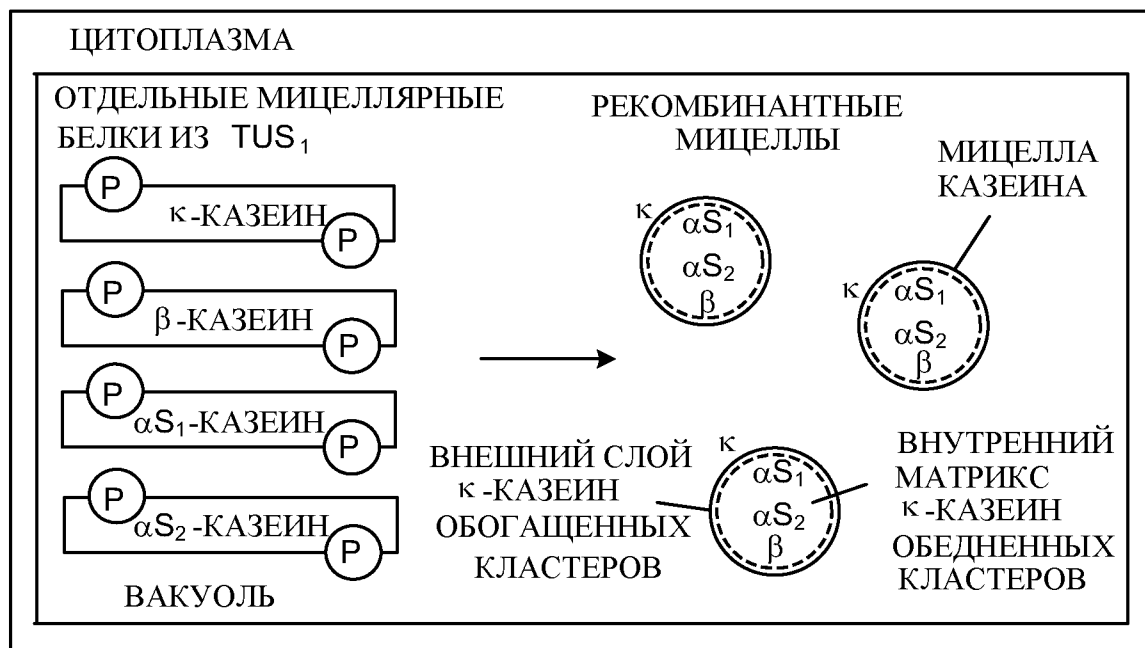
20. Способ по п. 16, в котором обработка семени предусматривает обработку измельченного семени кукурузы, риса, сорго, вигны, сои, маниоки, таро, кунжута, арахиса, гороха, хлопка, ямса или их комбинации.



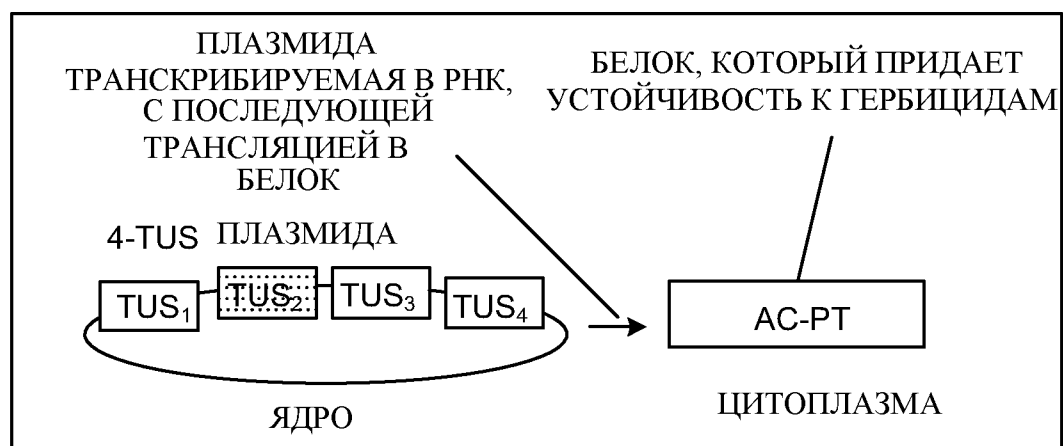
Фиг.1



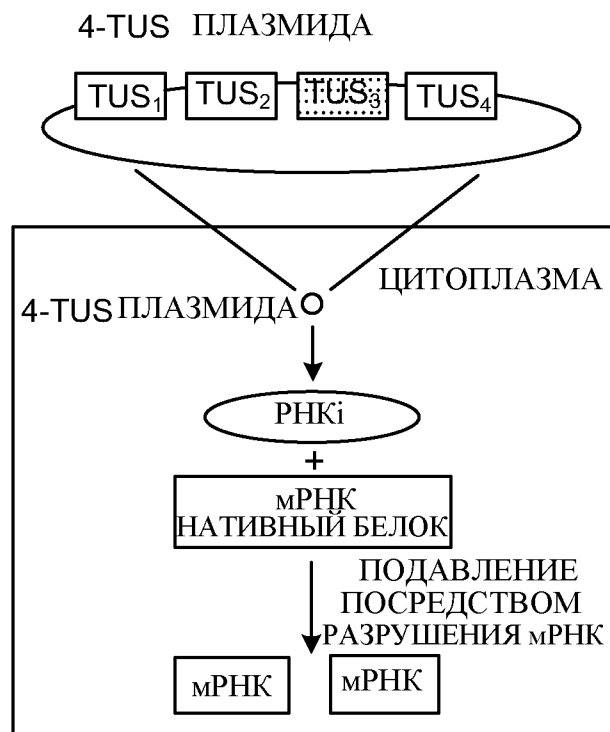
ФИГ.3А



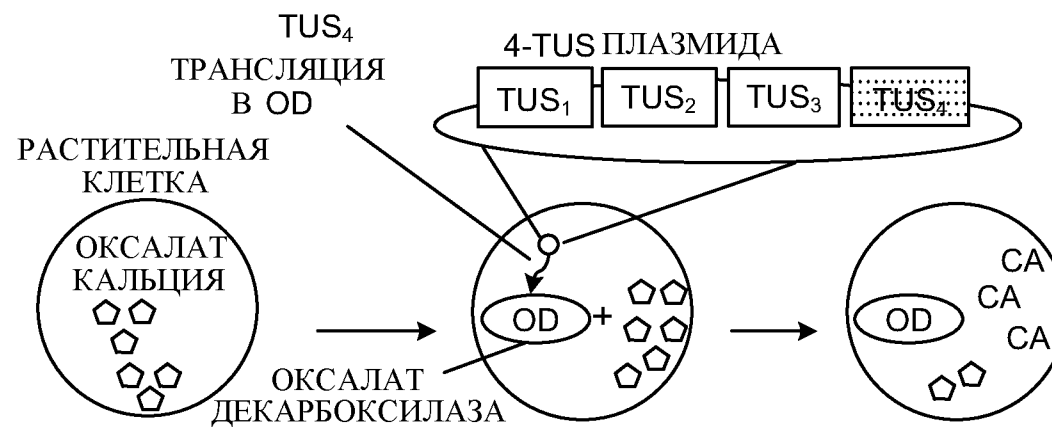
ФИГ.3В



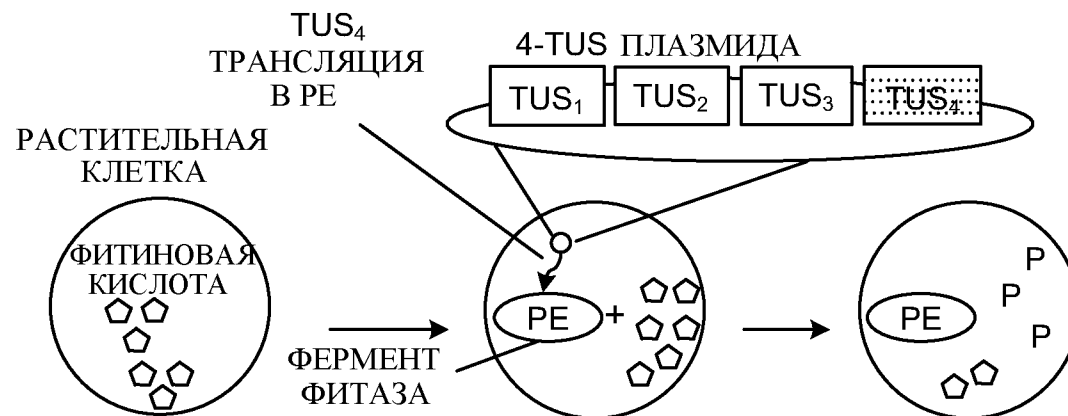
ФИГ.3С



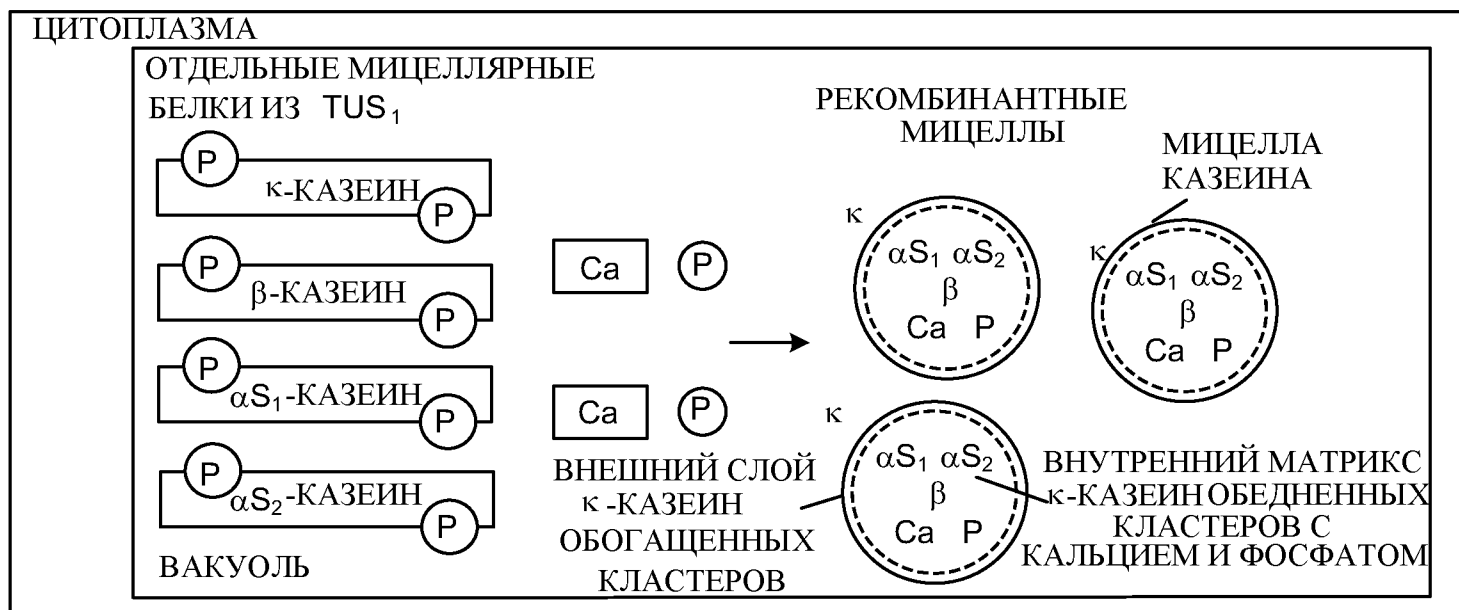
ФИГ.3D



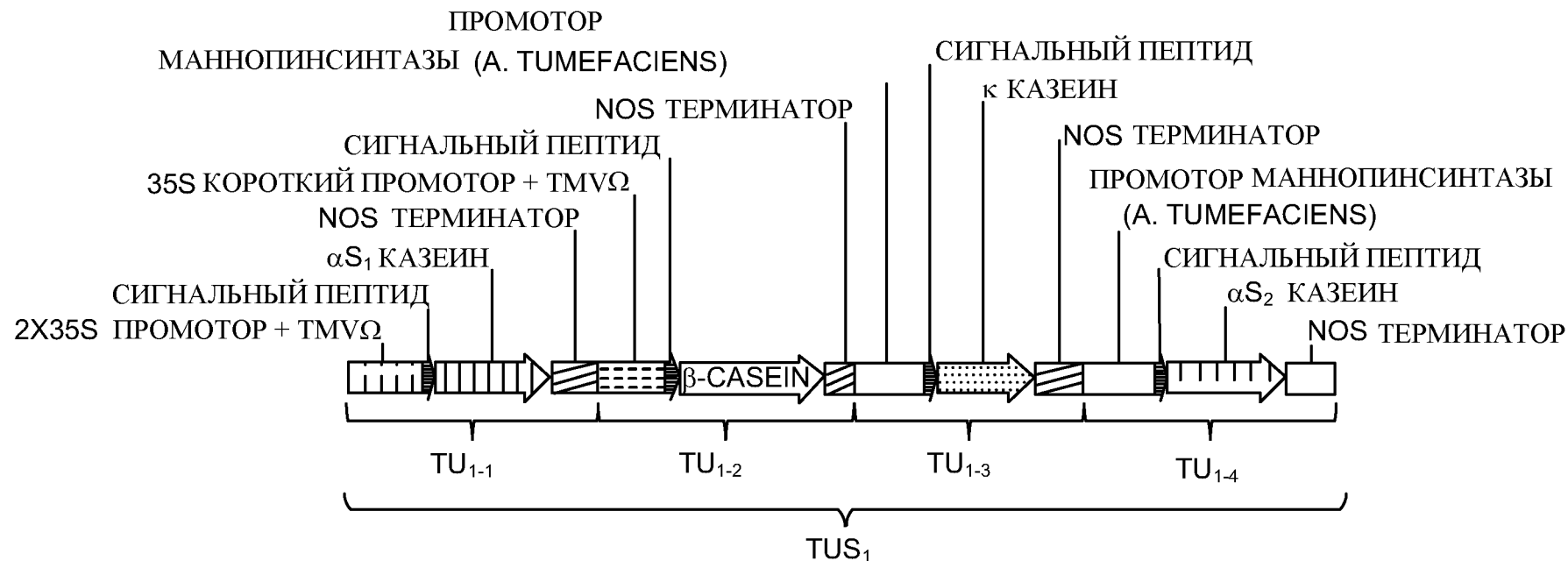
ФИГ.3Е



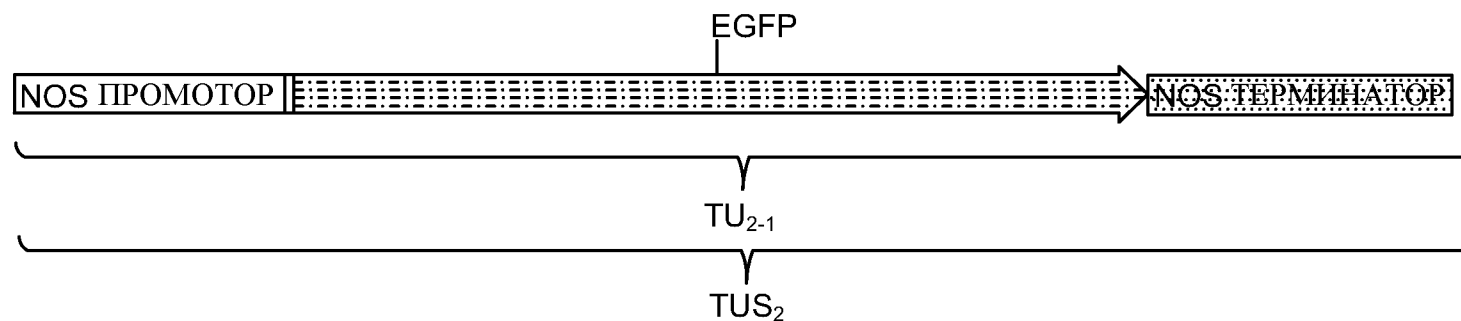
ФИГ.3F



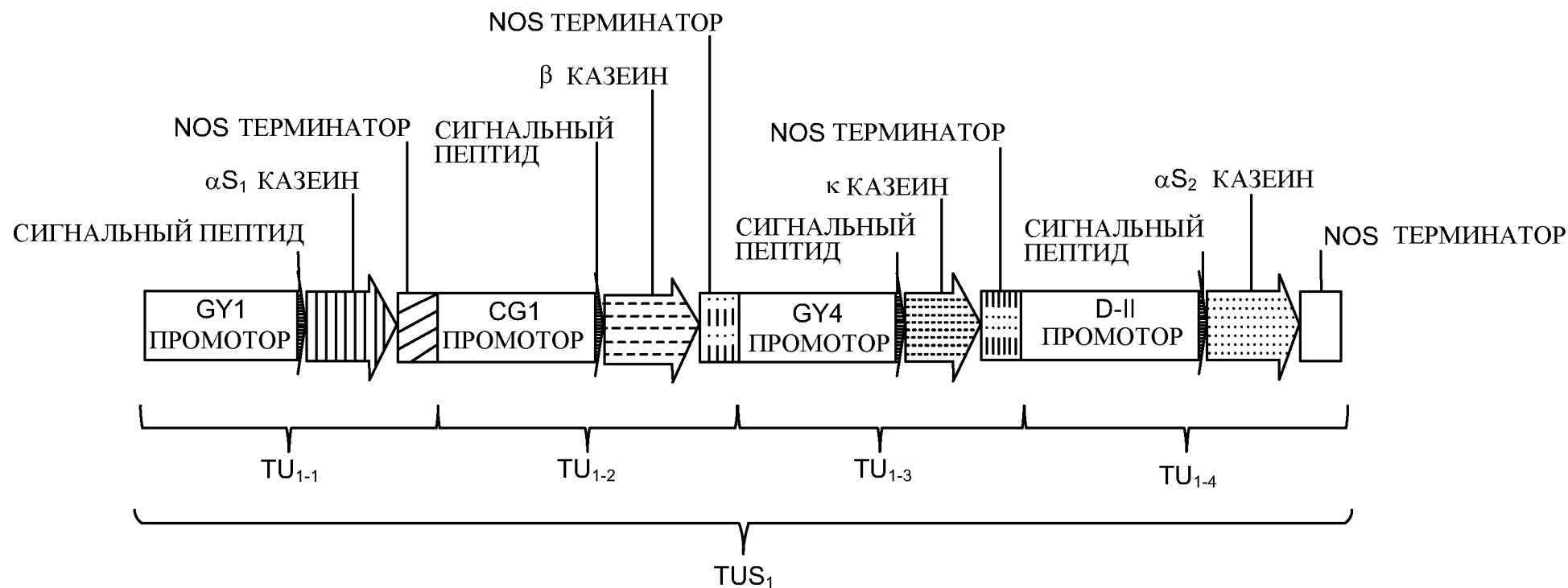
ФИГ.3G



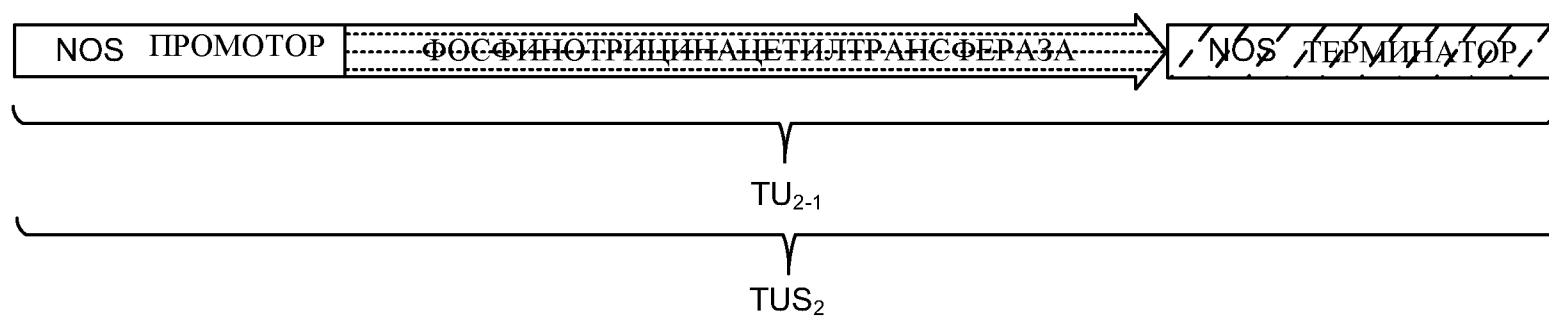
ФИГ.4



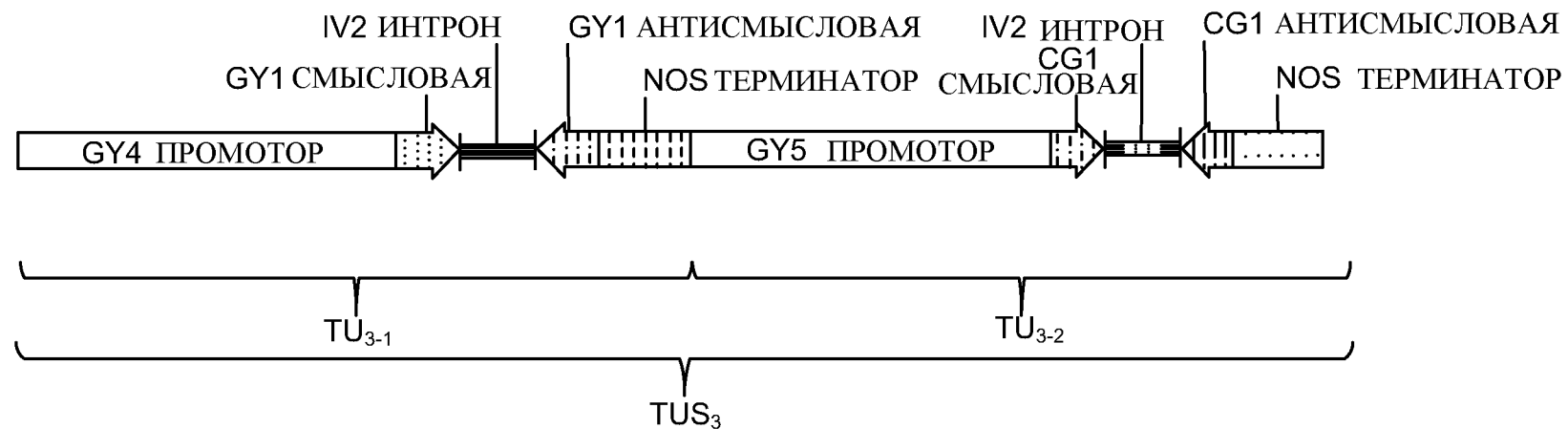
ФИГ.5



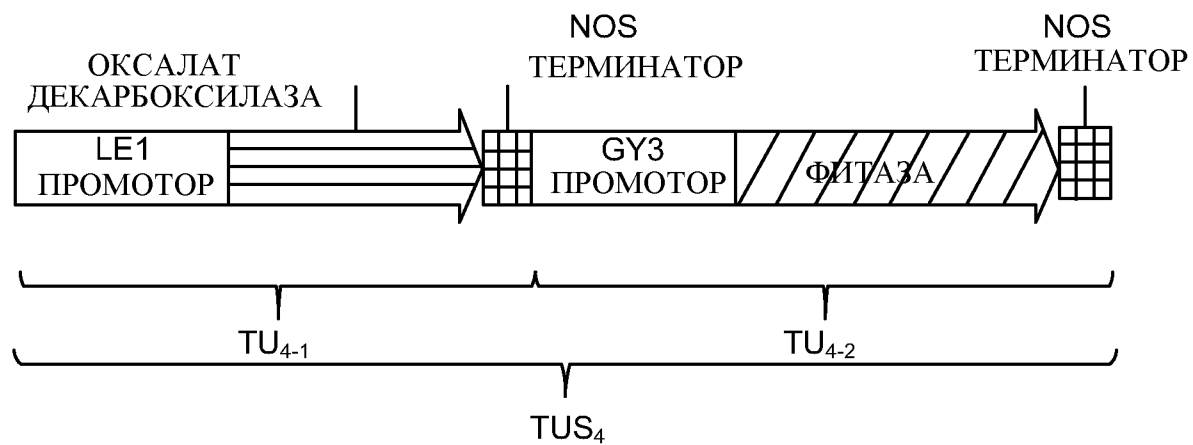
ФИГ.6



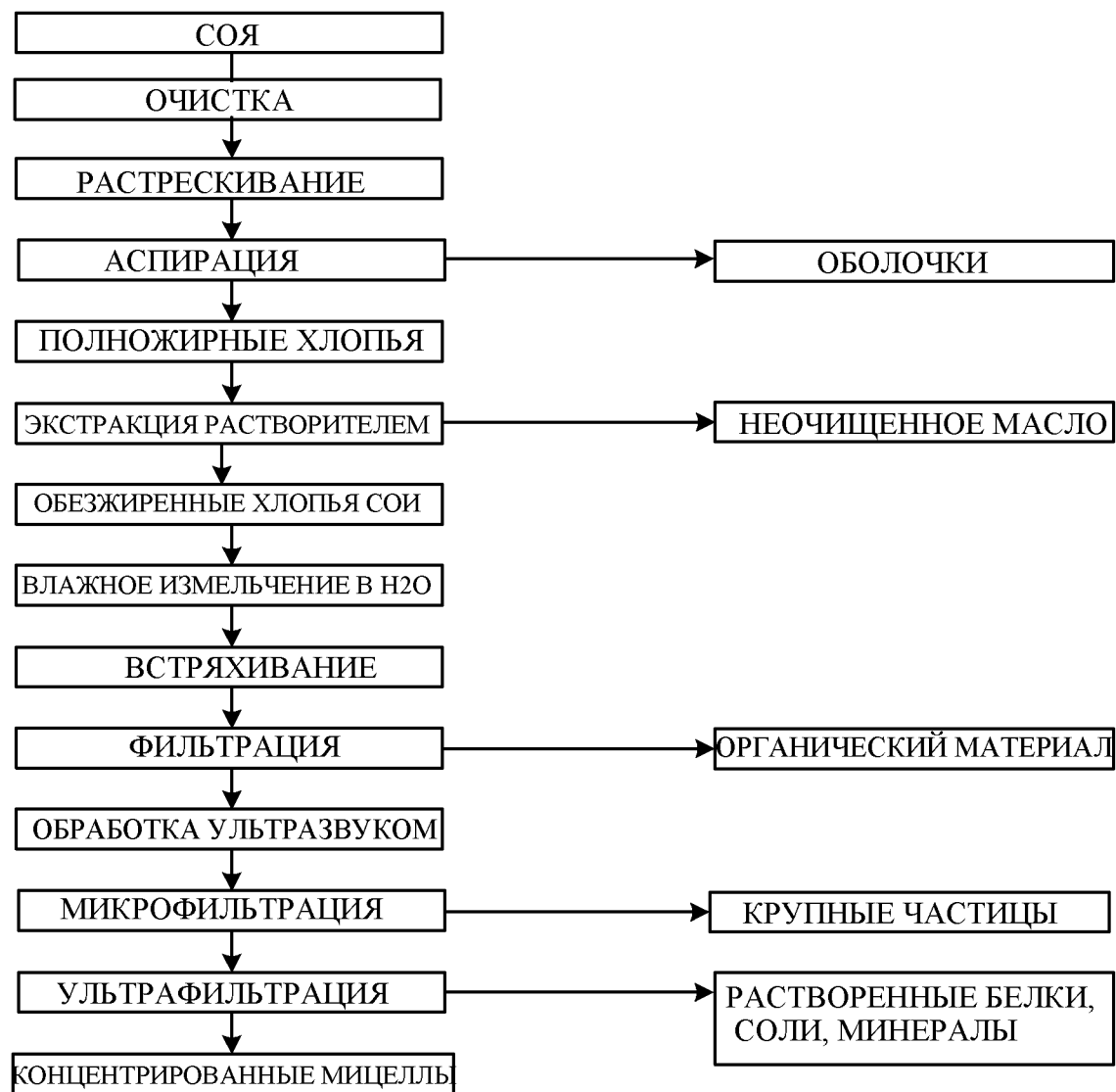
ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10