

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292309 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.28(22) Дата подачи заявки  
2017.09.14(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)  
C07K 14/415 (2006.01)  
A01H 5/10 (2006.01)  
A01H 6/28 (2006.01)(54) ТРИХОМАСПЕЦИФИЧНЫЕ ПРОМОТОРЫ ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ  
КАННАБИНОИДОВ И ДРУГИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖЕЛЕЗИСТЫХ ТРИХОМАХ

(31) 62/397,212

(32) 2016.09.20

(33) US

(62) 201990549; 2017.09.14

(71) Заявитель:  
22НД СЕНЧУРИ ЛИМИТЕД, ЛЛС  
(US)(72) Изобретатель:  
Раштон Пол (US)(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

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

A1

202292309

202292309

A1

# **ТРИХОМА-СПЕЦИФИЧНЫЕ ПРОМОТОРЫ ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ КАННАБИНОИДОВ И ДРУГИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖЕЛЕЗИСТЫХ ТРИХОМАХ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/397,212, поданной 20 сентября 2016 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

**[0002]** Согласно настоящему техническому решению в общем виде предложены трихома-специфичные промоторы генов фермента биосинтеза каннабиноидов из *Cannabis* (конопли), нуклеотидные последовательности трихома-специфичных промоторов и варианты применения промоторов для модулирования продукции каннабиноидов или для модулирования другой трихома-специфичной продукции биохимических веществ в организмах. Согласно настоящему техническому решению также предложены трансгенные клетки и организмы, включая клетки растений и растения, содержащие трихома-специфичные промоторы.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0003]** Следующее описание представлено для облегчения понимания читателя. Какая-либо представленная информация или какие-либо процитированные источники не признаются представляющими собой известный уровень техники.

**[0004]** Трихомы растений представляют собой эпидермальные выросты, включая разветвленные и неразветвленные волоски, пузырьки, шипы, иглы и жгучие волоски, покрывающие листья, прицветники и стебли. Существует два основных класса трихом, которые можно различить на основании их способности продуцировать и секретировать или накапливать вторичные метаболиты, а именно: железистые трихомы и нежелезистые трихомы. Нежелезистые трихомы демонстрируют низкую метаболическую активность и обеспечивают защиту растения, главным образом, с помощью физических средств. Напротив, железистые трихомы, которые присутствуют на листе многих видов растений, включая некоторые виды пасленовых (например, табак, томат), а также коноплю, являются в высокой степени метаболически

активными и накапливают метаболиты, которые могут составлять до 10 – 15% сухой массы листа (Wagner et al., *Ann. Bot.* 93:3-11 (2004)). Железистые трихомы способны секретировать (или накапливать) вторичные метаболиты в качестве механизма защиты.

**[0005]** *Cannabis sativa* L. (конопля, посевная конопля, марихуана), однолетнее травянистое растение, которое культивируют в течение тысяч лет, содержит уникальный набор вторичных метаболитов, называемых каннабиноидами, которые образуют группу терпенофеноловых соединений. Каннабиноиды преимущественно синтезируются и накапливаются в железистых трихомах, присутствующих в большом количестве на женских цветках и в меньшем количестве на мужских цветках растений *C. sativa*. Накопление каннабиноидов в полости запасаания трихом обеспечивает растению преимущество, поскольку каннабиноиды, как известно, являются цитотоксическими для других клеток растений и, как было показано, индуцируют апоптоз в суспензионных культурах клеток посевной конопли и табака (Sirikantaramas et al., *Plant Cell Physiol.* 46:1578-1582 (2005)). Каннабиноиды образуются в результате трехэтапного биосинтетического процесса: образования поликетид, ароматического пренилирования и циклизации (**ФИГ. 1**). Путь синтеза каннабиноидов снабжается гексаноил-КоА, образование которого катализируется гексаноил-КоА-синтетазой. Первый ферментативный этап в биосинтезе каннабиноидов представляет собой образование 3,5,7-триоксододеcanoил-КоА ферментом тетракетид-синтазой (tetraketide synthase, TKS), называемой синтазой оливетоловой кислоты (olivetolic acid synthase, OLS1). Второй ферментативный этап в биосинтезе каннабиноидов представляет собой образование оливетоловой кислоты циклазой оливетоловой кислоты (olivetolic acid cyclase, OAC). Следующий этап представляет собой пренилирование оливетоловой кислоты с образованием ароматической пренилтрансферазой каннабигероловой кислоты (cannabigerolic acid, CBGA). CBGA представляет собой центральный промежуточный продукт точки разветвления для биосинтеза различных основных классов каннабиноидов. Альтернативная циклизация пренильной боковой цепи CBGA позволяет получить  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловую кислоту (tetrahydrocannabinolic acid, THCA) или ее изомеры – каннабидиоловую кислоту (cannabidiolic acid, CBDA) или каннабихроменовую кислоту (cannabichromenic acid, CBCA). Затем THCA и CBDA декарбоксилируются в процессе неферментативной реакции в течение хранения или курения с образованием  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола (tetrahydrocannabinol, THC) или каннабидиола (cannabidiol, CBD), соответственно (**ФИГ. 1**).

**[0006]** Каннабиноиды представляют собой ценные природные вещества растительного происхождения. Препараты конопли, такие как марихуана и гашиш, применяли в течение столетий ввиду их хорошо известных психотропных эффектов. Возобновление интереса к каннабиноидам с точки зрения вариантов медицинского применения было обусловлено способностью данных веществ действовать посредством каннабиноидных рецепторов млекопитающих. Основные каннабиноиды включают  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинол (THC) – соединение, отвечающее за психотропные и терапевтические эффекты потребления марихуаны, и каннабидиол (CBD), который обладает нейропротекторными свойствами. (Gaoni & Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.* 86:1646-1647 (1964); Mechoulam et al., *J. Clin. Pharmacol.* 42:11S-19S (2002)). THCA представляет собой основной каннабиноид в лекарственных разновидностях конопли, тогда как CBDA является преобладающим каннабиноидом в формах посевной конопли, которые выращивают ради волокон или семян. В настоящее время каннабиноиды исследуют для терапевтических целей, включая лечение хронической боли, тошноты, контроля спастического состояния мышц и тремора у пациентов, страдающих от множественного склероза или эпилепсии, а также терапии артрита. Возможность прямой продукции каннабиноидов в трихомах позволяет избежать вмешательства в метаболические пути и характеристики растений. Соответственно, существует потребность в идентификации трихома-специфичных промоторов для модулирования синтеза каннабиноидов в организмах, включая трансгенные растения, трансгенные клетки и их потомков, что позволяет нацеливать экспрессию генов исключительно в трихомах.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

**[0007]** В настоящей заявке раскрыты трихома-специфичные промоторы и варианты применения данных промоторов для направления экспрессии кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты в трихомах растений.

**[0008]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из: (а) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-

26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

**[0009]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

**[0010]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

**[0011]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству *Solanacea*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение *Solanacea* представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству *Cannabaceae*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение *Cannabaceae* представляет собой растение *C. sativa*. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

**[0012]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0013]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0014]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0015]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0016]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную

последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0017]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0018]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0019]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0020]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении

предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0021]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0022]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0023]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0024]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в

SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0025]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0026]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0027]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 21 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0028]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 22 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0029]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 23 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0030]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 24 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0031]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 25 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0032]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 26 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0033]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 28 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0034]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 29 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0035]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0036]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 32 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0037]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0038]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение или клетка растения, содержащие химерный ген, встроенный в геном, причем химерный ген содержит трихома-специфичный промотор, функционально связанный с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, и причем промотор выбран из группы, состоящей из: (a) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

**[0039]** В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение или клетка растения относится к семейству *Solanacea*. В некоторых вариантах реализации растение *Solanacea* представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение относится к семейству

*Cannabaceae*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение *Cannabaceae* представляет собой *C. sativa*.

**[0040]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ экспрессии полипептида в трихомах растений, включающий: (a) введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из: (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения; причем последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид; и (b) выращивание растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию полипептида.

**[0041]** В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ увеличения уровня каннабиноида в трихоме растения-хозяина, включающий: (a) введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из: (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33; и (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения; причем последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент пути биосинтеза каннабиноидов; и (b) выращивание растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию фермента пути биосинтеза каннабиноидов; причем экспрессия фермента пути биосинтеза каннабиноидов приводит к получению растения, которое характеризуется повышенным содержанием каннабиноидов по сравнению с контрольным растением, выращенным в подобных условиях.

**[0042]** В некоторых вариантах реализации способа фермент пути биосинтеза каннабиноидов представляет собой синтазу каннабидиоловой кислоты (CBDA), синтазу каннабихроменовой кислоты (CBCA) или синтазу  $\Delta^9$ тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA).

**[0043]** В некоторых вариантах реализации способ также включает обеспечение растения каннабигероловой кислотой (CBGA).

**[0044]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен способ получения генетически сконструированного растения, которое характеризуется повышенным содержанием  $\Delta^9$ тетрагидроканнабинола (THC), каннабихромена (CBC) и/или каннабидиола (CBD) по сравнению с контрольным растением.

**[0045]** Технические решения, описанные и заявленные в настоящем документе, характеризуются множеством свойств и вариантов реализации, включая, без ограничения, таковые, представленные или описанные в данном кратком описании, либо на которые дается ссылка в данном описании. Данное описание не предназначено быть всеобъемлющим, и изобретения, описанные и заявленные в настоящем документе, не ограничены свойствами или вариантами реализации или не ограничиваются свойствами или вариантами реализации, определенными в данном кратком описании, которое включено исключительно с целью иллюстрации, а не ограничения. Дополнительные варианты реализации могут быть раскрыты в подробном описании ниже.

**[0046]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из: (a) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 31, 32 или 33; и (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 31, 32 или 33 и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

**[0047]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с

одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

**[0048]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

**[0049]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *C. sativa*.

**[0050]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения любого из 5, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

**[0051]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

**[0052]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий синтетическую молекулу ДНК, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.

**[0053]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированная клетка-хозяин представляет собой клетку *Nicotiana tabacum*.

[0054] В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *N. tabacum*. В некоторых вариантах реализации генетически сконструированное растение представляет собой растение *C. sativa*.

[0055] В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены семена генетически сконструированного растения, причем семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0056] На **ФИГ. 1** представлен путь биосинтеза каннабиноидов, который приводит к образованию основных каннабиноидов в *Cannabis sativa*:  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA) и каннабидиоловой кислоты (CBDA).

[0057] На **ФИГ. 2А-2В** представлен дизайн промотор:репортерный ген, который использовали в экспериментах, описанных в настоящем документе. Каждый промотор был слит с репортерным геном GUS; активность промотора показана синим цветом после окрашивания (**ФИГ. 2А**). **ФИГ. 2В** представляет собой вид трихома-специфичной экспрессии промоторов гена биосинтетического фермента каннабиноидов в трихомах табака в цельном листе. Показаны результаты для иллюстративного промотора (промотора гена CBDA-синтазы 20800). Результаты для других промоторов в пути биосинтеза каннабиноидов являются качественно идентичными (не показаны). На **ФИГ. 2В** представлено, что экспрессия репортерного гена ограничена трихомами.

[0058] На **ФИГ. 3** представлена трихома-специфичная экспрессия промоторов из полного пути биосинтеза каннабиноидов в трихомах табака. Активность промотора показана синим цветом, обусловленным активностью репортерного гена GUS. Иллюстративный промотор из каждого гена данного пути демонстрирует трихома-специфичную экспрессию, и вследствие этого все промоторы из генов данного пути будут направлять экспрессию в трихомах.

[0059] На **ФИГ. 4А** представлен дизайн синтетического промотора из 4-кратного фрагмента «Cannabinoid On» (CANON) согласно настоящему техническому решению. На **ФИГ. 4В** представлена трихома-специфичная экспрессия синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON согласно настоящему техническому решению. Активность синтетического промотора показана синим цветом, обусловленным активностью репортерного гена GUS.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### I. ВВЕДЕНИЕ

[0060] Настоящее техническое решение включает обнаружение последовательностей нуклеиновой кислоты двадцати трех трихома-специфичных промоторов ферментов, участвующих в пути биосинтеза каннабиноидов: (1) промотора оливетол-синтазы (OLS; также называется тетракетид-синтазой); (2) промотора OLS1; (3) промотора OLS2; (4) промотора циклазы оливетоловой кислоты (OAC); (5) промотора OAC1; (6) промотора ароматической пренилтрансферазы (prenyltransferase, PT); (7) промотора PT1; (8) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE1-1); (9) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE1-1'); (10) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE3); (11) промотора гексаноил-КоА-синтазы (AAE12); (12) промотора CBDA-синтазы (CBDAS); (13) промотора CBDA-синтазы 1 (CBDAS1); (14) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800; (15) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800'; (16) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603; (17) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603'; (18) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320; (19) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320'; (20) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330; (21) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330'; (22) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498; и (23) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 3498'.

[0061] Были определены последовательности нуклеиновой кислоты для каждого промотора. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора оливетол-синтазы (OLS), (ii) промотора OLS1 и (iii) промотора OLS2 представлены в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и открытая рамка считывания (ORF) OLS представлена в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора циклазы оливетоловой кислоты (OAC) представлена в SEQ ID NO: 5, последовательность нуклеиновой кислоты промотора OAC1 представлена в SEQ ID NO: 6, и ORF OAC представлена в SEQ ID NO: 7. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора ароматической

пренилтрансферазы (PT) представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность нуклеиновой кислоты промотора PT1 представлена в SEQ ID NO: 9, и OPC PT представлена в SEQ ID NO: 10. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1), (ii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1'); (iii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE3) и промотора (iv) гексаноил-КоА-синтетазы (AAE12) представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14, соответственно, и OPC гексаноил-КоА (AAE-1) представлена в SEQ ID NO: 15. Последовательности нуклеиновой кислоты промотора (i) CBDA-синтазы (CBDAS), (ii) промотора CBDAS-синтазы 1 (CBDAS1), (iii) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800 и (iv) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800' представлены в SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19, соответственно, и последовательность нуклеиновой кислоты OPC CBDA-синтазы (CBDAS) представлена в SEQ ID NO: 20. Последовательности нуклеиновой кислоты промотора (i) THCA-синтазы (THCAS) 19603, (ii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603', (iii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320, (iv) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320', (v) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330 и (vi) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330' представлены в SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 и 26, соответственно, и OPC THCAS представлена в SEQ ID NO: 27. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы (CBCAS) 3498 представлена в SEQ ID NO: 28, последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы (CBCAS) 3498' представлена в SEQ ID NO: 29, и OPC CBCA-синтазы (CBCAS) представлена в SEQ ID NO: 30.

**[0062]** Настоящее техническое решение также включает обнаружение последовательностей нуклеиновой кислоты фрагмента промотора «cannabinoid op», или «CANON», который является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии. Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента CANON, который является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в железистых трихомах, представлена в SEQ ID NO: 31. Последовательность нуклеиновой кислоты синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON, содержащего четыре копии консенсусного фрагмента CANON, представлена в SEQ ID NO: 33.

**[0063]** С учетом известных цитотоксических эффектов каннабиноидов, таких как THC, в отношении клеток растений экспрессия генов, управляющих продукцией

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

**[0064]** Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящее техническое решение обеспечивает не исследованные ранее трихома-специфичные промоторы из генов биосинтеза каннабиноидов или биологически активные фрагменты указанных промоторов, которые можно применять для генетического манипулирования синтезом каннабиноидов (например, THC, CBD, CBC, CBG) в растениях-хозяевах, таких как *C. sativa*, растениях семейства *Solanaceae* и в других семействах и видах растений, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

## **II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**[0065]** Все технические термины, используемые в настоящем описании, общепринято используются в биохимии, молекулярной биологии и сельском хозяйстве; следовательно, данные термины понятны специалистам в области, к которой относится настоящее техническое решение. Данные технические термины можно найти, например, в руководствах: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook and Russel (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001); *Current Protocols In Molecular Biology*, ed. Ausubel et al. (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988) (включая периодические обновленные издания); *Short Protocols In Molecular Biology: A Compendium Of Methods From Current Protocols In Molecular Biology* 5th ed., vol. 1-2, ed. Ausubel et al. (John Wiley & Sons, Inc., 2002); *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, vol. 1-2, ed. Green et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997). Методологии, включающие методики биологии растений, описаны в настоящем документе, а также подробно описаны в монографиях, таких как *Methods In Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*, ed. Maliga et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1995).

**[0029]** «Химерная нуклеиновая кислота» включает кодирующую последовательность или ее фрагмент, присоединенную к нуклеотидной

последовательности, отличающейся от нуклеотидной последовательности, с которой указанная кодирующая последовательность связана в клетках, в которых она присутствует в природе.

**[0066]** Термин **«кодирование»** обозначает процесс, посредством которого ген через механизмы транскрипции и трансляции обеспечивает клетке информацию, на основании которой серия аминокислот может быть собрана в конкретную аминокислотную последовательность для образования активного фермента. В связи с вырожденностью генетического кода определенные замены оснований в последовательности ДНК не изменяют аминокислотную последовательность белка.

**[0067]** **«Эндогенная нуклеиновая кислота»** или **«эндогенная последовательность»** является **«нативной»**, т.е. природной, для растения или организма, с которым будут проводить манипуляции методами генной инженерии. Данный термин обозначает нуклеиновую кислоту, ген, полинуклеотид, молекулу ДНК, РНК, мРНК или кДНК, которая присутствует в геноме растения или организма, с которым будут проводить манипуляции методами генной инженерии.

**[0068]** **«Экзогенная нуклеиновая кислота»** обозначает нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, которая была введена в клетку (или предок клетки) усилиями человека. Такая экзогенная нуклеиновая кислота может представлять собой копию последовательности, в природе обнаруживаемой в клетке, в которую она была введена, или фрагмент указанной последовательности.

**[0069]** В настоящем документе **«экспрессия»** обозначает продукцию продукта РНК путем транскрипции гена или продукцию полипептидного продукта, кодируемого нуклеотидной последовательностью. **«Сверхэкспрессия»** или **«повышающая регуляция»** используется для обозначения того, что экспрессия конкретной последовательности гена или ее варианта в клетке или растении, включая все полученные из него растения-потомки, была повышена в результате применения генной инженерии по сравнению с контрольной клеткой или растением.

**[0070]** **«Генная инженерия»** охватывает любую методологию введения нуклеиновой кислоты или конкретной мутации в организм-хозяин. Например, растение является генетически сконструированным, если оно трансформировано полинуклеотидной последовательностью, которая супрессирует экспрессию гена, в результате чего

экспрессия целевого гена снижается по сравнению с контрольным растением. В контексте настоящего изобретения **«генетически сконструированные»** включают трансгенные растения и клетки растений. Генетически сконструированное растение или клетка растения может представлять собой продукт любого природного подхода (т.е. не содержащий какие-либо чужеродные нуклеотидные последовательности), реализованного путем введения исключительно последовательностей нуклеиновой кислоты, полученных из вида растения-хозяина или из скрещиваемого вида растения. См., например, заявку на патент США № 2004/0107455.

**[0071] «Гетерологичная нуклеиновая кислота»** или **«гомологичная нуклеиновая кислота»** обозначает взаимоотношения между последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью и ее клеткой- или организмом-хозяином, в особенности, в контексте трансгенных организмов. Гомологичная последовательность обнаруживается в природе в виде-хозяине (например, растение конопли, трансформированное геном конопли), тогда как гетерологичная последовательность не обнаруживается в природе в клетке-хозяине (например, растение табака, трансформированное последовательностью из растений конопли). Такие гетерологичные нуклеиновые кислоты могут содержать сегменты, которые представляют собой копию последовательности, обнаруживаемой в природе в клетке, в которую ее ввели, или фрагмент указанной последовательности. В зависимости от контекста термин «гомолог» или «гомологичные» может в качестве альтернативы обозначать последовательности, которые являются потомками общей последовательности-предка (например, они могут представлять собой ортологи).

**[0072] «Повышение», «снижение», «модулирование», «изменение»** или т.п. обозначают сравнение с подобным сортом, разновидностью или клеткой, выращенными в подобных условиях, но без модификации, которая приводит к повышению, снижению, модуляции или изменению. В некоторых случаях контроль может представлять собой нетрансформированный контроль, ложно-трансформированный контроль или трансформированный вектором контроль.

**[0073]** Под **«выделенной молекулой нуклеиновой кислоты»** понимают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которую удалили из ее природного окружения. Например, рекомбинантные молекулы ДНК, содержащиеся в конструкции ДНК, считают выделенными для целей настоящего технического решения. Следующие

примеры выделенных молекул ДНК включают рекомбинантные молекулы ДНК, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или молекулы ДНК, которые являются частично или по существу очищенными, в растворе. Выделенные молекулы РНК включают транскрипты РНК *in vitro* молекул ДНК согласно настоящему техническому решению. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению также включают такие молекулы, полученные синтетическим способом.

**[0074] «Растение»** представляет собой термин, который охватывает целые растения, органы растения (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, дифференцированные или недифференцированные клетки растений, а также их потомство. Растительный материал включает, без ограничения, семена, суспензионные культуры, зародыши, меристемные области, ткани каллуса, листья, корни, побеги, стебли, плоды, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры.

**[0075] «Культура клеток растения»** обозначает культуры частей растения, таких как, например, протопласты, клетки культуры клеток, клетки в тканях растения, пыльцу, пыльцевые трубки, семязпочки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития. В некоторых вариантах реализации настоящего технического решения предложена трансгенная культура ткани или трансгенная культура клеток растения, причем трансгенная культура ткани или клеток содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению.

**[0076] «Промотор»** обозначает область ДНК в направлении 3'-5' от начала транскрипции, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы и других белков для инициации транскрипции. **«Конститутивный промотор»** является активным в течение всей жизни растения и при большинстве условий окружающей среды. Тканеспецифичный, тканепредпочтительный, специфичный к типу клеток и индуцибельный промоторы образуют класс **«неконститутивных промоторов»**. **«Трихома-специфичный промотор»** представляет собой промотор, который предпочтительно направляет экспрессию функционально связанного гена в ткани трихом по сравнению с экспрессией в корне, листе, стебле или других тканях растения. **«Функционально связанный»** обозначает функциональную связь между промотором и второй последовательностью, причем последовательность промотора иницирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй

последовательности. Как правило, «функционально связанный» обозначает, что связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются смежными.

**[0077]** «Идентичность последовательности» или «идентичность» в контексте двух полинуклеотидных последовательностей (нуклеиновой кислоты) или полипептидных последовательностей включает указание на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в пределах указанной области. Если процент идентичности последовательности используется применительно к белкам, следует учитывать, что положения оснований, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными заменами аминокислот, когда остатки аминокислот замещены другими остатками аминокислот с подобными химическими свойствами, такими как заряд и гидрофобность, и вследствие этого функциональные свойства молекулы не изменяются. Когда последовательности отличаются консервативными заменами, процент идентичности последовательности можно откорректировать в сторону увеличения с поправкой на консервативную природу замены. Говорят, что последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, характеризуются «**подобием последовательности**» или «**подобием**». Средства для осуществления данной корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. Как правило, такие средства включают подсчет консервативной замены как частичного вместо полного несоответствия и посредством этого увеличение процента идентичности последовательности. Таким образом, например, если идентичной аминокислоте присваивают показатель 1, а неконсервативной замене присваивают показатель ноль, консервативной замене присваивают показатель от нуля до 1. Балльную оценку консервативных замен вычисляют, например, в соответствии с алгоритмом Мейерса и Миллера, Meyers & Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17 (1988), который реализован в программе PC/GENE (Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

**[0078]** Использование в настоящем описании процента идентичности последовательности обозначает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух

последовательностей. Процент вычисляют посредством определения числа положений, в которых в обеих последовательностях обнаружено идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

**[0079]** Термины **«супрессия»** или **«понижающая регуляция»** используются в качестве синонимов и обозначают, что экспрессия конкретной последовательности гена или ее варианта в клетке или растении, включая все полученные из него растения-потомки, была понижена в результате применения генной инженерии по сравнению с контрольной клеткой или растением.

**[0080]** **«Трихома»** включает в настоящем документе различные типы трихом – железистые трихомы и/или нежелезистые трихомы.

**[0081]** **«Клетки трихомы»** обозначает клетки, составляющие структуру трихомы, такие как железистые или секреторные клетки, базальные клетки и стебельковые клетки, или «клетки полосы», внеклеточная полость и клетки кутикулы. Трихомы могут также состоять из одной единичной клетки.

**[0082]** **«Конопля»** или **«растение конопли»** обозначает любые виды рода *Cannabis*, продуцирующие каннабиноиды, такие как *Cannabis sativa*, и их межвидовые гибриды.

**[0083]** **«Вариант»** представляет собой нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая отличается от стандартной или данной нуклеотидной или аминокислотной последовательности конкретного гена либо полипептида. Термины **«изоформа»**, **«изотип»** и **«аналог»** также обозначают формы «варианта» нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Аминокислотную последовательность, измененную в результате добавления, удаления или замены одной или более аминокислот, или изменение в нуклеотидной последовательности можно считать вариантом последовательности. Вариант полипептида может содержать **«консервативные»** изменения, при которых замененная аминокислота характеризуется подобными структурными или химическими свойствами, например, замену лейцина изолейцином. Вариант полипептида может содержать **«неконсервативные»** изменения, например, замену глицина триптофаном.

Аналогичные незначительные вариации могут также включать делеции или инсерции аминокислот или как делеции, так и инсерции. Указания для определения того, какие остатки аминокислот могут быть заменены, встроены или делетированы, можно найти с применением компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники, таких как программное обеспечение Vector NTI Suite (InforMax, MD). Вариант можно также обозначать как **«перетасованный ген»**, такой как гены, описанные в патентах, переуступленных компании Maxugen (см., например, патент США № 6,602,986).

[0084] В настоящем документе термин **«приблизительно»** будет понятен средним специалистам в данной области техники и будет в некоторой степени варьировать в зависимости от контекста, в котором его используют. Если использование термина не понятно средним специалистам в данной области техники с учетом контекста, в котором используются данные термины, «приблизительно» будет означать до плюс или минус 10% от конкретного термина.

[0085] Термин **«биологически активные фрагменты»**, или **«функциональные фрагменты»**, или **«фрагменты, обладающие активностью промотора»**, обозначает фрагменты нуклеиновой кислоты, способные обеспечивать транскрипцию в одном или более типах трихом и/или в одной или более клетках трихом, обнаруженных на одном или более различных типах тканей и органов растения. Биологически активные фрагменты обеспечивают трихома-специфичную и/или по меньшей мере трихома-предпочтительную экспрессию и предпочтительно обладают по меньшей мере подобной силой (или более высокой силой) по сравнению с промотором согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 или 11-15. Силу можно изучить путем трансформации растения таким фрагментом, предпочтительно, функционально связанным с репортерным геном, и качественного (пространственно-временная транскрипция) и/или количественного анализа активности промотора в трихомах. В некоторых вариантах реализации сила промотора и/или фрагментов промотора согласно настоящему техническому решению является количественно идентичной или превышает таковую промотора CaMV 35S при измерении в железистых трихомах. В некоторых вариантах реализации биологически активный фрагмент промотора трихом, описанного в настоящем документе, может составлять приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно

35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% от полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты промотора. В других вариантах реализации биологически активный фрагмент нуклеиновой кислоты промотора трихом, описанного в настоящем документе, может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот. В третьих вариантах реализации биологически активный фрагмент нуклеиновой кислоты промотора трихом, описанный в настоящем документе, может составлять (1) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 554 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS (например, SEQ ID NO: 1); (2) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 550 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS1 (SEQ ID NO: 2); (3) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 558 смежных нуклеиновых кислот для промотора OLS2 (SEQ ID NO: 3); (4) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 996 смежных нуклеиновых кислот для промотора OAC (например, SEQ ID NO: 5); (5) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 992 смежных нуклеиновых кислот для промотора OAC1 (например, SEQ ID NO: 6); (6) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 1361 смежных нуклеиновых кислот для промотора PT (например, SEQ ID NO: 8); (7) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 1357 смежных нуклеиновых кислот для промотора PT1 (например, SEQ ID NO: 9); (8) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 805 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE1-1 (например, SEQ ID NO: 11); (9) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 800 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE1-1' (например, SEQ ID NO: 12); (10) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 1000 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE3 (например, SEQ ID NO: 13); (11) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 869 смежных нуклеиновых кислот для промотора AAE12 (например, SEQ ID NO: 14); (12) от приблизительно 10 смежных нуклеиновых кислот до приблизительно 420 смежных

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

приблизительно 950, приблизительно 1000, приблизительно 1050, приблизительно 1100, приблизительно 1150, приблизительно 1200, приблизительно 1250 или приблизительно 1300 смежных нуклеиновых кислот.

### **III. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КЛЕТОК- И ОРГАНИЗМОВ-ХОЗЯЕВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРИХОМА-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ**

#### *A. Трихома-специфичные промоторы*

**[0086]** Раскрытие настоящего технического решения включает идентификацию двадцати трех промоторов, которые способны регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, функционально связанных с ними, в клетках трихом.

**[0087]** Соответственно, настоящее техническое решение обеспечивает выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, причем последовательность нуклеиновой кислоты способна регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, функционально связанных с ней, в клетках трихом. Между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты могут возникать различия в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или где-либо между данными концевыми положениями, введенные между нуклеотидами в эталонной последовательности по отдельности или в одной или более смежных группах в пределах эталонной последовательности.

**[0088]** Настоящее техническое решение также включает биологически активные «варианты» SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 с одним или более удаленными, замещенными, встроенными или добавленными основаниями, причем последовательность нуклеиновой кислоты способна регулировать транскрипцию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты,

функционально связанных с ней, в клетках трихом. Варианты SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 включают последовательности нуклеиновой кислоты, которые характеризуются идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более с SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33 и которые являются трихома-специфичными по своей активности.

**[0089]** В некоторых вариантах реализации настоящего технического решения полинуклеотиды (промоторы) модифицируют для создания вариаций в последовательностях молекулы, например, для усиления их промоторных активностей, с применением способов, известных в данной области техники, таких как модификация ДНК на основе ПЦР или стандартные методики мутагенеза, либо путем химического синтеза модифицированных полинуклеотидов.

**[0090]** Соответственно, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, могут быть усечены или могут содержать делеции и все еще сохранять способность направлять транскрипцию функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты в трихомах. Минимальную длину области промотора можно определить путем последовательного удаления последовательностей с 5'- и 3'-концов выделенного полинуклеотида с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, включая, без ограничения, удаление фрагментов рестрикционного фермента или расщепление нуклеазами.

**[0091]** Трихома-специфичные промоторы согласно настоящему техническому решению также можно применять для экспрессии нуклеиновой кислоты, которая снизит или заингибирует экспрессию нативного гена в растении. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозимы, смысловые агенты супрессии или другие продукты, которые ингибируют экспрессию нативного гена.

[0092] Трихома-специфичные промоторы согласно настоящему техническому решению также можно применять для экспрессии белков или пептидов в вариантах применения «молекулярного производства». Такие белки или пептиды включают, без ограничения, промышленные ферменты, антитела, терапевтические средства и продукты питания.

[0093] В некоторых вариантах реализации новые гибридные промоторы могут быть разработаны или сконструированы с помощью множества способов. Множество промоторов содержат последовательности в направлении 3'-5', которые активируют, усиливают или определяют силу и/или специфичность промотора. См., например, публикацию Atchison, *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:127 (1988). Например, гены Т-ДНК содержат «ТАТА»-боксы, определяющие сайт инициации транскрипции, и другие элементы в направлении 3'-5', расположенные в направлении 3'-5' от сайта инициации транскрипции, для модулирования уровней транскрипции.

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

[0094] В некоторых вариантах реализации раскрытие настоящего технического решения также включает идентификацию молекулы нуклеиновой кислоты, называемой фрагмент «Cannabinoid On» или «CANON», которая достаточна для направления трихома-специфичной экспрессии функционально связанных с ней кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты.

[0095] Фрагмент CANON размером 171 пару оснований (SEQ ID NO: 31) представлен ниже в **таблице 1**. Консенсусный фрагмент CANON (выделен) представлен в **таблице 1** вместе с предполагаемым ТАТА-боксом (жирный шрифт с подчеркиванием), 5'-UTR и стартовым кодоном («atg», жирный шрифт с подчеркиванием) как SEQ ID NO: 32. Консенсусная последовательность получена из трихома-специфичных промоторов из THCA-синтаз 19603, 1330 и 50320, CBCA-синтазы 3498 и CBDA-синтазы 20800. Фрагмент CANON размером 171 пару оснований (SEQ ID NO: 31) является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в железистых трихомах табака (и конопли).

[0096] Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая четыре копии фрагмента CANON перед одной копией минимального промотора (т.е. ТАТ-бокс,

начало транскрипции и первый ATG), называемая «синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON», также представлена в **таблице 1** как SEQ ID NO: 33. Первый фрагмент CANON согласно SEQ ID NO: 33 представлен жирным шрифтом, за ним следует второй фрагмент, выделенный подчеркиванием, за ним следует третий фрагмент, представленный жирным шрифтом, и четвертый фрагмент, выделенный подчеркиванием.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Таблица 1. Последовательности фрагмента CANON.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Фрагмент Cannabinoid On («CANON») (171 п.о.)</b><br>atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa<br>aggtgcctaatttttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta<br>taaaatatattaagtcaattttctttgccccactccaatatataatgt (SEQ ID NO: 31)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Фрагмент CANON с предполагаемым TATA-боксом, 5'-UTR и стартовым кодоном (232 п.о.)</b><br>atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa<br>aggtgcctaatttttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta<br>taaaatatattaagtcaattttctttgccccactccaatatataatgt <u>tataaataggataat</u><br>tctcaattcatagtaattcaaaaatcattaggactaaagaaaaatg (SEQ ID NO: 32)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON (709 п.о.)</b><br><b>atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa</b><br><b>aggtgcctaatttttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta</b><br><b>taaaatatattaagtcaattttctttgccccactcc</b> <u>atgatgccaaactatttcaatgtacaat</u><br><u>gtacattttatttttaataagggcttcacctaacaaaggtgcctaatttttgtgaactttttt</u><br><u>ttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaatatattaagtcaattttctttgcc</u><br><u>ccactccatgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttca</u><br><u>cctaacaaaggtgcctaatttttgtgaactttttttaccacatgtgactatttaatgacta</u><br><u>tcaaattataaaatatattaagtcaattttctttgccccactccatgatgccaaactattcaa</u><br><u>tgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaaaggtgcctaatttttgtga</u><br><u>acttttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaatatattaagtcaatt</u><br><u>tctttgccccactccaatatataatgttataaataggataatttctcaattcatagtaattc</u><br>aaaaatcattaggactaaagaaaaatg (SEQ ID NO: 33) |

**[0097]** Фрагмент CANON является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в промоторе с приобретением функции. Без конкретного теоретического обоснования считают, что фрагмент CANON отвечает за трихома-специфичную экспрессию множества генов биосинтетического фермента каннабиноидов, включая THCA-, CBDA- и CBCA-синтазы.

### *C. Конструкции нуклеиновой кислоты*

**[0098]** В некоторых вариантах реализации последовательности трихома-специфичного промотора и фрагменты CANON согласно настоящему техническому решению или биологически активные фрагменты указанных последовательностей можно встроить в

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

**[0099]** В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более

из оливогенол-синтазы (OLS), циклазы оливогеновой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации линия клеток растений содержит вектор экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливогенол-синтазы (OLS), циклазы оливогеновой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации трансгенное растение содержит вектор экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливогенол-синтазы (OLS), циклазы оливогеновой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации предложены способы генетического модулирования продукции каннабиноидов, причем указанные способы включают: введение вектора экспрессии, который содержит промотор или фрагмент CANON, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливогенол-синтазы (OLS), циклазы оливогеновой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы.

**[0100]** В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид,

такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтетазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации линия клеток растений содержит один или более промоторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтетазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации трансгенное растение содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтетазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы. В другом варианте реализации предложены способы генетического модулирования уровня продукции каннабиноидов, причем указанные способы включают введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, который содержит один или более промоторов или фрагментов CANON, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активный фрагмент указанной последовательности, функционально связанный с кДНК, кодирующей полипептид, такой как одна или более из оливетол-синтазы (OLS), циклазы оливетоловой кислоты (OAC), ароматической пиренилтрансферазы (PT), гексаноил-КоА-синтетазы (AEE1-1), CBDA-синтазы, CBCA-синтазы и THCA-синтазы.

**[0101]** Конструкции могут содержаться в векторе, таком как вектор экспрессии, приспособленный для экспрессии в соответствующей клетке (растения)-хозяине. Следует понимать, что достаточным будет любой вектор, который позволяет получить растение, содержащее введенную последовательность ДНК.

**[0102]** Подходящие векторы хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в общеизвестных технических руководствах, таких как Pouwels et al., *Cloning Vectors, A Laboratory Manual*, Elsevier, Amsterdam (1986). Были описаны векторы для трансформации растений (см., например, публикацию Schardl et al., *Gene* 61:1-14 (1987)). В некоторых вариантах реализации конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой плазмидный вектор или бинарный вектор. Примеры подходящих векторов включают Ti-плазмидные векторы.

**[0103]** Рекомбинантные конструкции нуклеиновой кислоты (например, векторы экспрессии), способные вводить нуклеотидные последовательности или химерные гены под контроль трихома-специфичной регуляторной последовательности (например, промотора, фрагмента CANON), могут быть получены с применением стандартных методик, обычно известных в данной области техники. Для получения химерного гена вектор экспрессии, как правило, содержит функционально связанную в направлении от 5'-к 3'-концу последовательность трихома-специфичного промотора или последовательность CANON, которая направляет транскрипцию гомологичной или гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в направлении 5'-3', за которой необязательно следует 3'-нетранслируемая область нуклеиновой кислоты (3'-UTR), которая кодирует сигнал полиаденилирования, функционирующий в клетках растений, чтобы вызывать терминацию транскрипции и добавление полиаденилатных нуклеотидов к 3'-концу мРНК, кодирующей белок. Гомологичная или гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой последовательность, кодирующую белок или пептид, либо она может представлять собой последовательность, которая транскрибируется в активную молекулу РНК, такую как смысловая и/или антисмысловая РНК, подходящая для сайленсирования гена или семейства генов в клетке- или организме-хозяине. Векторы экспрессии также, как правило, содержат селективируемый маркер. Обычные регуляторные последовательности в направлении 5'-3' содержат сайт инициации транскрипции, участок связывания рибосомы, РНК-процессирующий сигнал, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

**[0104]** В некоторых вариантах реализации векторы экспрессии согласно настоящему техническому решению могут содержать последовательности терминации, расположенные в направлении 5'-3' от молекулы нуклеиновой кислоты согласно

настоящему техническому решению, в результате чего транскрипция мРНК останавливается, и добавленные полиА-последовательности. Примеры терминаторов включают терминатор нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos), терминатор маннопинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Tmas) и терминатор CaMV 35S (T35S). Области терминации включают область терминации малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы гороха (TrbcS) или область терминации Tnos. Вектор экспрессии также может содержать энхансеры, стартовые кодоны, сигнальные последовательности сплайсинга и нацеливающие последовательности.

**[0105]** В некоторых вариантах реализации векторы экспрессии согласно настоящему техническому решению могут содержать селективный маркер, с помощью которого трансформированные клетки можно идентифицировать в культуре. Маркер может быть связан с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты, т.е. геном, функционально связанным с промотором. В настоящем документе термин «маркер» обозначает ген, кодирующий свойство или фенотип, который позволяет проводить селекцию или скрининг в отношении растения или клетки, содержащих маркер. У растений, например, ген-маркер будет кодировать устойчивость к антибиотику или гербициду. Ген-маркер позволяет проводить отбор трансформированных клеток от клеток, которые не были трансформированы или трансфицированы.

**[0106]** Примеры подходящих селективируемых маркеров включают, без ограничения, аденозиндезаминазу, дигидрофолатредуктазу, гигромицин-В-фосфотрансферазу, тимидинкиназу, ксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу, устойчивость к глифосату и глюфосинату и амино-гликозид 3'-О-фосфотрансферазу (устойчивость к канамицину, неомицину и G418). Данные маркеры могут включать устойчивость к G418, гигромицину, блеомицину, канамицину и гентамицину. Конструкция может также содержать селективируемый ген-маркер *bar*, который обеспечивает устойчивость к гербицидным аналогам фосфинотрицина, таким как глюфосинат аммония. См., например, публикацию Thompson et al., *EMBO J.* 9:2519-23 (1987)). Можно также применять другие подходящие селективные маркеры, известные в данной области техники.

**[0107]** Можно применять визуальные маркеры, такие как зеленый флуоресцирующий белок (green florescent protein, GFP). Также были описаны способы идентификации или

селекции трансформированных растений на основе контроля деления клеток. См., например, публикации WO 2000/052168 и WO 2001/059086.

**[0108]** Также можно добавить последовательности репликации бактериального или вирусного происхождения для обеспечения клонирования вектора в бактерии- или фаге-хозяине. Предпочтительно, применяют прокариотическую точку начала репликации с широким диапазоном хозяев. Можно добавить селектируемый маркер для бактерий для обеспечения отбора бактериальных клеток, несущих желаемую конструкцию. Подходящие прокариотические селектируемые маркеры также включают устойчивость к антибиотикам, таким как канамицин или тетрациклин.

**[0109]** В векторе также могут присутствовать другие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие дополнительные функции, как известно в данной области техники. Например, если хозяином является *Agrobacterium*, можно добавить последовательности Т-ДНК, чтобы способствовать последующему переносу и встраиванию в хромосомы растения.

**[0110]** Способна ли последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению или ее биологически активный фрагмент обеспечивать транскрипцию конкретно в трихомах, и является ли активность «сильной», можно определить с применением различных способов. Для определения пространственно-временной активности промотора или фрагмента CANON (т.е. того, является ли промотор или фрагмент CANON активным в определенной ткани или органе (например, трихомах, либо в определенных условиях окружающей среды или развития)) применяют качественные способы (например, гистологическое окрашивание GUS ( $\beta$ -глюкуронидазой)). Количественные способы (например, флуориметрические анализы GUS) также количественно определяют уровень активности по сравнению с контролями. Подходящие контроли включают, без ограничения, растения, трансформированные пустыми векторами (отрицательные контроли), или трансформированные конструкциями, содержащими другие промоторы, такие как промотор CER6 *Arabidopsis*, который является активным в эпидермисе и трихомах *Nicotiana tabacum*.

**[0111]** Для исследования или количественного определения активности промотора или фрагмента CANON согласно настоящему техническому решению последовательность

нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33, или биологически активные фрагменты указанной последовательности можно функционально связать с известной последовательностью нуклеиновой кислоты (например, репортерным геном, таким как *gusA*, или любым геном, кодирующим конкретный белок), и можно применять для трансформации клетки растения с помощью известных способов. Активность промотора или фрагмента CANON можно, например, проанализировать (и необязательно количественно определить) путем обнаружения уровня РНК-транскриптов последовательности нуклеиновой кислоты в направлении 5'-3' в клетках трихом методом количественной ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) или другими методами на основе ПЦР. В качестве альтернативы, репортерный белок или активность репортерного белка можно проанализировать и количественно определить с помощью, например, флуориметрического анализа GUS, если репортерный ген представляет собой ген *gus*.

[0112] В некоторых вариантах реализации промоторы согласно настоящему техническому решению можно применять для управления экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, в клетках трихом. Гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать любой созданный человеком рекомбинантный или встречающийся в природе или белок, такой как фермент пути биосинтеза каннабиноидов оливетол-синтаза (OLS), циклаза оливетоловой кислоты (OAC), ароматическая пренилтрансфераза (PT), гексаноил-КоА-синтетаза (AAE1-1), CBDA-синтаза, THCA-синтаза или CBCA-синтаза, представленные в SEQ ID NO: 4, 7, 10, 15, 20, 27 и 30, соответственно.

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

[0113] Конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению можно применять для трансформации клетки-хозяина, такой как клетка растения. В некоторых вариантах реализации конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему техническому решению применяют для трансформации по меньшей мере части клеток растения. Данные векторы экспрессии можно временно ввести в клетки растения-хозяина или стабильно встроить в геномы клеток растения-хозяина для получения трансгенных растений с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники.

[0114] Способы введения конструкций нуклеиновой кислоты в клетку или растение хорошо известны в данной области техники. Подходящие способы введения конструкций нуклеиновой кислоты (например, векторов экспрессии) в трихомы растений для получения трансгенных растений включают, без ограничения, опосредованную агробактериями (*Agrobacterium*) трансформацию, доставку методом генной пушки, микроинъекцию, электропорацию, трансформацию протопластов с помощью полиэтиленгликоля и опосредованную липосомами трансформацию. В способах трансформации двудольных растений преимущественно применяют *Agrobacterium tumefaciens*.

[0115] *Agrobacterium rhizogenes* можно применять для получения трансгенных культур «бородатых корней» растений, включая коноплю и табак, как описано, например, в публикации Guillon et al., *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:341-6 (2006). «Бородатые корни табака» обозначают корни табака, которые содержат Т-ДНК из Ri-плазмиды *Agrobacterium rhizogenes*, встроенную в геном, и растут в культуре без добавления ауксина и других фитогормонов.

[0116] Кроме того, растения можно трансформировать путем трансформации на основе *Rhizobium*, *Sinorhizobium* или *Mesorhizobium* (Broothaerts et al., *Nature* 433: 629-633 (2005)).

[0117] После трансформации клеток растения или растения те клетки растения или те растения, в которые была встроена желаемая ДНК, можно отобрать с помощью таких способов как устойчивость к антибиотикам, устойчивость к гербицидам, толерантность к аналогам аминокислот или с применением фенотипических маркеров.

[0118] Трансгенные растения можно применять в общепринятой схеме скрещивания растений, такой как скрещивание, самоопыление или обратное скрещивание, для получения дополнительных трансгенных растений, содержащих трансген.

[0119] Подходящие клетки-хозяева включают клетки растений. Любое растение может являться подходящим хозяином, включая однодольные растения или двудольные растения, такие как, например, маис/кукуруза (виды *Zea*, например, *Z. mays*, *Z. diploperennis* (чапуле), *Zea luxurians* (гватемальская теосинте), *Zea mays* подвид *huehuetenangensis* (теосинте Сан-Антонио Гуиста), *Z. mays* подвид *mexicana* (мексиканская теосинте), *Z. mays* подвид *parviglumis* (бальзовая теосинте), *Z. perennis*

(теосинте многолетняя) и *Z. ramosa*, пшеница (виды *Triticum*), ячмень (например, *Hordeum vulgare*), овес (например, *Avena sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*), рожь (*Secale cereale*), соя (*Glycine* spp, например, *G. max*), хлопок (виды *Gossypium*, например, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (например, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa* и т.д.), подсолнечник (*Helianthus annuus*), табак (виды *Nicotiana*), люцерна (*Medicago sativa*), рис (виды *Oryza*, например, группа сортов *O. sativa indica* или *japonica*), кормовые травы, африканское просо (виды *Pennisetum*, например, *P. glaucum*), виды деревьев, виды овощей, такие как *Lycopersicon* ssp (недавно вновь классифицированный как принадлежащий к роду *Solanum*), например, томат (*L. esculentum*, syn. *Solanum lycopersicum*) такой как, например, томат «черри», var. *cerasiforme* или смородиновидный томат, var. *pimpinellifolium*) или томатное дерево (*S. betaceum*, syn. *Cyphomandra betaceae*), картофель (*Solanum tuberosum*) и другие виды *Solanum*, такие как баклажан (*Solanum melongena*), пегино (*S. muricatum*), кокона (*S. sessiliflorum*) и наранхилла (*S. quitoense*); перцы (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*), горох (например, *Pisum sativum*), фасоль (например, виды *Phaseolus*), морковь (*Daucus carota*), виды *Lactuca* (такие как *Lactuca sativa*, *Lactuca indica*, *Lactuca perennis*), огурец (*Cucumis sativus*), дыня (*Cucumis melo*), кабачок (*Cucurbita pepo*), тыква (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita mixta*), тыква обыкновенная (*Cucurbita pepo*), арбуз (*Citrullus lanatus* syn. *Citrullus vulgaris*), виды сочных плодов (виноград, персики, сливы, клубника, манго, дыня), декоративные виды (например, роза, *Petunia*, *Chrysanthemum*, лилия, тюльпан, виды *Gerbera*), древесные деревья (например, виды *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), волокнистые виды, например, лен (*Linum usitatissimum*) и посевная конопля (*Cannabis sativa*). В некоторых вариантах реализации растение представляет собой *Cannabis sativa*. В некоторых вариантах реализации растение представляет собой *Nicotiana tabacum*.

**[0120]** Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящее техническое решение предусматривает применение трихома-специфичных промоторов и/или фрагментов CANON, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, представленные в SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 и 31-33, или биологически активные фрагменты указанных последовательностей, для генетического регулирования синтеза каннабиноидов (например, THC, CBD, CBC) или других молекул в растениях-хозяевах, таких как *C. sativa*, растения семейства *Solanaceae*,

такие как *N. tabacum*, и другие семейства растений и виды, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

[0121] Настоящее техническое решение также предусматривает системы культур клеток (например, культуры клеток растений, культуры клеток бактерий или грибов, культуры клеток человека или млекопитающих, культуры клеток насекомых), содержащие генетически сконструированные клетки, трансформированные молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации предложена культура клеток, которая содержит клетки, содержащие промотор или фрагмент CANON согласно настоящему техническому решению.

[0122] Для определения того, демонстрирует ли клетка растения изменения в экспрессии гена, можно применять различные анализы, например, нозерн-блоттинг или количественную ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). Из трансформированной клетки общепринятыми способами можно регенерировать целые трансгенные растения. Такие трансгенные растения можно размножить или провести их самоопыление для получения гомозиготных линий. Такие растения образуют семена, содержащие гены для введенного свойства, и их можно выращивать для получения растений, которые будут образовывать выбранный фенотип.

[0123] Для усиления экспрессии и/или накопления молекулы, представляющей интерес, в клетках трихом и/или для способствования очистке молекулы из клеток трихом можно применять способы понижающей регуляции по меньшей мере одной молекулы, эндогенной для трихом растений. Трихомы, как известно, содержат большое количество компонентов и метаболитов, которые препятствуют продукции других молекул в клетках трихом. Данные соединения и метаболиты включают, например, протеазы, полифенолоксидазу (РРО), полифенолы, кетоны, терпеноиды и алкалоиды. Была описана понижающая регуляция таких компонентов трихом. См., например, патент США № 7,498,428.

## ПРИМЕРЫ

[0124] Следующие примеры предложены исключительно в качестве иллюстрации, а не ограничения. Специалисты в данной области техники с легкостью определяют множество некритичных параметров, которые можно изменить или модифицировать

для получения по существу таких же или подобных результатов. Примеры ни в коем случае не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего технического решения, который определен в прилагаемой формуле изобретения.

#### Пример 1: Идентификация трихома-специфичных промоторов

**[0125]** Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора оливетол-синтазы (OLS), (ii) промотора OLS1 и (iii) промотора OLS2 представлены в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и открытая рамка считывания (OPC) OLS представлена в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора циклазы оливетоловой кислоты (OAC) представлена в SEQ ID NO: 5, последовательность нуклеиновой кислоты промотора OAC1 представлена в SEQ ID NO: 6, и OPC OAC представлена в SEQ ID NO: 7. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора ароматической пренилтрансферазы (PT) представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность нуклеиновой кислоты промотора PT1 представлена в SEQ ID NO: 9, и OPC PT представлена в SEQ ID NO: 10. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1), (ii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1'); (iii) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE3) и (iv) промотора гексаноил-КоА-синтетазы (AAE12) представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14, соответственно, и OPC гексаноил-КоА (AAE-1) представлена в SEQ ID NO: 15. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора CBDA-синтазы (CBDAS), (ii) промотора CBDAS-синтазы 1 (CBDAS1), (iii) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800 и (iv) промотора CBDA-синтазы (CBDAS) 20800' представлены в SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19, соответственно, и последовательность нуклеиновой кислоты OPC CBDA-синтазы (CBDAS) представлена в SEQ ID NO: 20. Последовательности нуклеиновой кислоты (i) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603, (ii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 19603', (iii) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320, (iv) промотора THCA-синтазы (THCAS) 50320', (v) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330 и (vi) промотора THCA-синтазы (THCAS) 1330' представлены в SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 и 26, соответственно, и OPC THCAS представлена в SEQ ID NO: 27. Последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы (CBCAS) 3498 представлена в SEQ ID NO: 28, последовательность нуклеиновой кислоты промотора CBCA-синтазы (CBCAS) 3498' представлена в SEQ ID NO: 29, и OPC CBCA-синтазы (CBCAS) представлена в SEQ ID NO: 30.

[0126] Трихома-специфичные промоторы были идентифицированы путем проведения поиска для предварительной версии геномной последовательности *Cannabis sativa* с применением механизма поиска BLAT с кодирующими областями генов биосинтетического фермента в пути биосинтеза каннабиноидов. Для каждого совпадения геномной последовательности запускали программу прогнозирования гена (с применением программы FGENESH), чтобы установить первый ATG. Затем устанавливали сайт начала транскрипции путем сравнения геномной последовательности с наиболее длинными доступными последовательностями кДНК в базе данных NCBI NR. Как множественные выравнивания последовательности (для генов CBDA- и THCA-синтазы), так и введение запросов в базе данных PLACE позволили установить области ТАТА-боксов. После установления стартового кодона, сайта начала транскрипции и ТАТА-боксов было подтверждено расположение и последовательность промоторов.

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

[0127] Каннабиноиды синтезируются и накапливаются в трихомах конопли. Оливетол-синтаза (OLS), циклаза оливетоловой кислоты (ОАК), ароматическая пренилтрансфераза (РТ), гексаноил-КоА-синтетаза (AAE1-1), CBDA-синтаза, CBCA-синтаза и THCA-синтаза являются ферментами пути биосинтеза каннабиноидов. Соответственно, ожидают, что промоторы для каждого из данных ферментов будут направлять экспрессию кодируемых нуклеиновых кислот в клетках трихом. В данном примере продемонстрировано применение трихома-специфичных промоторов согласно настоящему техническому решению или биологически активных фрагментов указанных промоторов для экспрессии биосинтетических ферментов каннабиноидов в растениях и клетках растений, которые в природе не продуцируют каннабиноиды.

Способы

[0128] *Конструкции вектора.* Последовательности промотора (SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28, 29 или 31-33) помещали перед маркером GUS-A в вектор, приспособленный для экспрессии в клетке *Nicotiana tabacum*, такой как Ti-плазмидный вектор. Конструкции встраивали в *Agrobacterium tumefaciens* и использовали для трансформации *N. tabacum* в соответствии со способами, известными в данной области

техники. Конструкции трансформировали и регенерировали при селекции с канамицином, и первичные регенеранты (T<sub>0</sub>) выращивали для получения семян.

[0129] В качестве контроля табак трансформировали конструкцией, содержащей промотор табака *NtCPS2*. Было показано, что промотор *NtCPS2* является в высокой степени эффективным для направления трихома-специфичной экспрессии в *N. tabacum* (Sallaud et al., *The Plant Journal* 72:1-17 (2012)).

[0130] *Анализ экспрессии.* Количественные и качественные анализы активности β-глюкуронидазы (GUS) проводили на растениях T<sub>1</sub>. Качественный анализ активности промотора проводили с применением гистологических анализов GUS и с помощью визуализации зеленого флуоресцентного белка (GFP) с использованием флуоресцентного микроскопа. В случае анализов GUS различные части растения инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C в присутствии атмосферного кислорода с субстратом Xglue (соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронидциклогексиламина) в фосфатном буфере (1 мг/мл, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мкМ, pH 7,2, 0,2% Triton X-100). Образцы обесцвечивали повторяющимися промывками этанолом. В качестве отрицательных контролей использовали нетрансгенные растения. Предполагают, что трихомы трансгенных растений с OLS:GUS, OAC:GUS, PT:GUS, AAEE1-1:GUS, CBDAS:GUS, CBCAS:GUS и THCAS:GUS продемонстрируют яркосинее окрашивание, тогда как ткани данных трансгенных растений, отличные от трихом, и трихомы нетрансгенных контрольных растений не будут окрашены.

[0131] Количественный анализ активности промотора проводили с применением флуориметрического анализа GUS. Образцы суммарного белка получали из материала молодого листа; образцы получали из объединенных частей листьев. Свежий материал листа измельчали в ФБР (фосфатном буферном растворе) с применением металлических частиц с последующим центрифугированием и сбором супернатанта.

## Результаты

[0132] Растения и клетки растений, которые подвергали генно-инженерным манипуляциям с помощью векторов экспрессии, содержащих промоторы согласно настоящему техническому решению или биологически активные фрагменты указанных промоторов, демонстрировали трихома-специфичную транскрипционную активность. Как представлено на **ФИГ. 2В**, трихомы трансгенного растения, трансформированного

CBDAS 20800:GUS, продемонстрировали ярко-синее окрашивание, тогда как ткани, отличные от трихом растения, не были окрашены. Трихома-специфичная экспрессия для других промоторов в пути биосинтеза каннабиноидов является качественно подобной (**ФИГ. 3**). Результаты, представленные на **ФИГ. 3**, демонстрируют трихома-специфичную экспрессию промоторов из полного пути биосинтеза каннабиноидов в трихомах табака. Соответственно, данные результаты демонстрируют, что промоторы из полного пути биосинтеза каннабиноидов, описанные в настоящем документе, являются подходящими для предпочтительного направления экспрессии функционально связанного гена в ткани трихом по сравнению с экспрессией в корне, листе, стебле или других тканях растения. Данная трихома-специфичная экспрессия является важнейшим инструментом для регулирования биосинтеза трихома-специфичных биохимических соединений, таких как цитотоксические каннабиноиды. Кроме того, данные промоторы являются важными для стратегий, направленных на применение трихом табака или конопли в качестве биологических фабрик для контролируемой продукции конкретных биохимических соединений.

Пример 3: Идентификация фрагментов «Cannabinoid On» («CANON») для направления трихома-специфичной экспрессии в *Nicotiana tabacum*

[0133] Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента «Cannabinoid On» («CANON») представлена в SEQ ID NO: 31. Последовательность нуклеиновой кислоты фрагмента CANON вместе с предполагаемым TATA-боксом, 5'-UTR и стартовым кодоном представлена в SEQ ID NO: 32. Последовательность нуклеиновой кислоты синтетического промотора из 4-кратного фрагмента CANON представлена в SEQ ID NO: 33. Консенсусный фрагмент CANON получен из трихома-специфичных промоторов из THCA-синтаз 19603, 1330, 50320, CBCA-синтазы 3498 и CBDA-синтазы 20800.

Способы

[0134] Фрагменты CANON были идентифицированы путем проведения поиска для геномной последовательности Purple Kush с применением механизма поиска BLAT. Поиск BLAT для геномной последовательности Purple Kush с применением гена THCA-синтазы позволил получить следующие результаты:

Результаты поиска в BLAT

| ACTIONS         |  | QUERY | SCORE | START | END | QSIZE | IDENTITY | CHRO          | STRAND | START  | END    | SPAN |
|-----------------|--|-------|-------|-------|-----|-------|----------|---------------|--------|--------|--------|------|
| browser details |  | THCA  | 979   | 1     | 979 | 979   | 100.0%   | scaffold19603 | +      | 6901   | 7879   | 979  |
| browser details |  | THCA  | 499   | 257   | 979 | 979   | 89.4%    | scaffold50320 | -      | 8585   | 9462   | 878  |
| browser details |  | THCA  | 466   | 257   | 979 | 979   | 89.1%    | scaffold1330  | -      | 2572   | 3369   | 798  |
| browser details |  | THCA  | 332   | 593   | 979 | 979   | 94.2%    | scaffold3498  | +      | 9881   | 10270  | 390  |
| browser details |  | THCA  | 275   | 590   | 979 | 979   | 85.6%    | scaffold6274  | +      | 24419  | 24803  | 385  |
| browser details |  | THCA  | 271   | 590   | 979 | 979   | 86.5%    | scaffold39155 | -      | 4079   | 4464   | 386  |
| browser details |  | THCA  | 251   | 1     | 258 | 979   | 97.7%    | scaffold17297 | +      | 9858   | 10113  | 256  |
| browser details |  | THCA  | 222   | 590   | 979 | 979   | 86.0%    | scaffold46100 | -      | 1795   | 2130   | 386  |
| browser details |  | THCA  | 206   | 3     | 271 | 979   | 89.0%    | scaffold33063 | -      | 10241  | 10479  | 239  |
| browser details |  | THCA  | 196   | 578   | 979 | 979   | 91.2%    | scaffold20800 | -      | 4646   | 5042   | 397  |
| browser details |  | THCA  | 167   | 69    | 267 | 979   | 94.7%    | scaffold12036 | +      | 133813 | 134227 | 415  |
| browser details |  | THCA  | 156   | 89    | 258 | 979   | 96.5%    | scaffold17775 | -      | 18105  | 18274  | 170  |
| browser details |  | THCA  | 142   | 260   | 514 | 979   | 87.5%    | scaffold59317 | +      | 863    | 1300   | 438  |
| browser details |  | THCA  | 136   | 120   | 268 | 979   | 96.6%    | scaffold12751 | -      | 46584  | 46732  | 149  |
| browser details |  | THCA  | 128   | 120   | 257 | 979   | 97.1%    | scaffold87266 | -      | 12096  | 12233  | 138  |
| browser details |  | THCA  | 128   | 120   | 257 | 979   | 97.1%    | scaffold23985 | +      | 18853  | 18990  | 138  |
| browser details |  | THCA  | 127   | 120   | 258 | 979   | 96.4%    | scaffold14882 | +      | 59722  | 59860  | 139  |
| browser details |  | THCA  | 123   | 98    | 269 | 979   | 85.9%    | scaffold4283  | -      | 23256  | 23416  | 161  |

[0135] Выделенные промоторы были выбраны для последующего анализа; проводили сравнение последовательностей пяти промоторов. Пять промоторов продемонстрировали высокую степень подобия последовательности от сайта начала трансляции до приблизительно 160 пар оснований в направлении 3'-5' от предполагаемого ТАТА-бокса, но невысокую степень подобия последовательности в направлении 3'-5' от ТАТА-бокса.

[0136] Из пяти промоторов получали консенсусную последовательность, и последовательность использовали для исследования трихома-специфичной активности промотора в трихомах табака с применением синтетического промотора, названного «синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON». Синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON содержит четыре копии консенсусного фрагмента CANON, который не обнаружен в природе, перед одной копией минимального промотора (ТАТА-бокс, сайт начала транскрипции и первый АТГ). *N. tabacum* трансформировали синтетическим промотором из 4-кратного фрагмента CANON, помещенным перед маркером GUS-A, как описано в примере 2, и проводили анализ экспрессии GUS.

## Результаты

[0137] Как представлено на ФИГ. 4В, синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON направляет экспрессию в трихомах. Соответственно, данные результаты демонстрируют, что фрагмент CANON является достаточным для направления трихома-специфичной экспрессии в промоторе с приобретением функции и вследствие этого отвечает за трихома-специфичную экспрессию большого числа

генов биосинтетического фермента каннабиноидов, включая THCA-, CBDA- и CBCA-синтазы.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

**[0138]** Настоящее техническое решение не следует считать ограниченным рамками конкретных вариантов реализации, описанных в настоящей заявке, которые используются в качестве единичных иллюстраций отдельных аспектов настоящего технического решения. Можно осуществить множество модификаций и вариаций настоящего технического решения в пределах его сущности и объема, как будет понятно специалистам в данной области техники. Специалистам в данной области техники из приведенных выше описаний будут понятны функционально эквивалентные способы и аппараты в пределах объема настоящего технического решения в дополнение к таковым, перечисленным в настоящем документе. Такие модификации и вариации предназначены для включения в пределы объема прилагаемой формулы изобретения. Настоящее техническое решение ограничено исключительно рамками прилагаемой формулы изобретения наряду с полным объемом эквивалентов, на которые имеет право данная формула изобретения. Следует понимать, что настоящее техническое решение не ограничено конкретными способами, реактивами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, разумеется, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

**[0139]** Помимо этого, когда свойства или аспекты настоящего раскрытия описаны в понятиях групп Маркуша, специалисты в данной области техники понимают, что раскрытие посредством этого также описано в понятиях любого индивидуального члена или подгруппы членов группы Маркуша.

**[0140]** Как понимает специалист в данной области техники, для любой и всех целей, в особенности, применительно к обеспечению письменного описания, все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон можно с легкостью признать в достаточной степени описывающим и позволяющим разделить тот же диапазон на по меньшей мере равные половины, третьи, четвертые,

пятые, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем документе, можно с легкостью разделить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Как также понимает специалист в данной области техники, все выражения, такие как «до», «по меньшей мере», «более», «менее» и т.п., включают указанное число и обозначают диапазоны, которые могут быть впоследствии разбиты на поддиапазоны, как обсуждается выше. Наконец, как понимает специалист в данной области техники, диапазон включает каждое индивидуальное число. Таким образом, например, группа, содержащая 1 – 3 клетки, обозначает группы, содержащие 1, 2 или 3 клетки. Аналогично группа, содержащая 1 – 5 клеток, обозначает группы, содержащие 1, 2, 3, 4 или 5 клеток, и т.д.

**[0141]** Все общедоступные документы, ссылки на которые или цитаты из которых содержатся в настоящем документе, такие как патенты, заявки на патент, предварительные заявки и публикации, включая учетные номера базы данных GenBank, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, включая все чертежи и таблицы, в той мере, в какой они не противоречат явным идеям настоящего описания.

**[0142]** Другие варианты реализации изложены в следующей формуле изобретения.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

### SEQ ID NO: 1 (554 п.о.)

#### Промотор тетракетид-синтазы/оливетол-синтазы (OLS)

AAAAATAAAATTAATAAATTTTTAATTATTAATATCATTTTATTTTTTAA  
TAAATAAATATCATTTTTATATTATTATAAATATGTATAAAGTTTTAATTG  
TATACAAGAAGTCTTATAGTAAGAGTATACACCTTACATCATAATAACTA  
CTCGATCTGAAATCAATGGTCAAGAAAAGTTCCCTACCGGTAGGAAACTT  
TTGCTAGATCCTACCATAGTCTTCCCTTATATTTATTATGTAGAATCTAT  
TATTATATCTAATAATTAACAAATATTAACAAATCATTTTGAAAAATTAT  
ATTAACAAAAAACTTGAAAAGTCAAAGATTAACCATCAATTTGCCAAAT  
CAAATTAGTGAGAAAGTAGGTATTATATACCTAACACTCATTTTACATAT  
GTCTAGACGTTTATATGTATAGCGTTGTTGTGTGTAATAAGTTCACTTGT  
AGTATCTTGTACATACATAATATATATATATAGGTGTGTTTGTGAACAAT  
TATATTATCACACATACACAACCTCATTTATTATCATAATAATAATAATACC  
ATGG

### SEQ ID NO: 2 (550 п.о.)

#### Промотор тетракетид-синтазы/оливетол-синтазы 1 (OLS1)

AAAAATAAAATTAATAAATTTTTAATTATTAATATCATTTTATTTTTTAA  
TAAATAAATATCATTTTTATATTATTATAAATATGTATAAAGTTTTAATTG  
TATACAAGAAGTCTTATAGTAAGAGTATACACCTTACATCATAATAACTA  
CTCGATCTGAAATCAATGGTCAAGAAAAGTTCCCTACCGGTAGGAAACTT  
TTGCTAGATCCTACCATAGTCTTCCCTTATATTTATTATGTAGAATCTAT  
TATTATATCTAATAATTAACAAATATTAACAAATCATTTTGAAAAATTAT  
ATTAACAAAAAACTTGAAAAGTCAAAGATTAACCATCAATTTGCCAAAT  
CAAATTAGTGAGAAAGTAGGTATTATATACCTAACACTCATTTTACATAT  
GTCTAGACGTTTATATGTATAGCGTTGTTGTGTGTAATAAGTTCACTTGT  
AGTATCTTGTACATACATAATATATATATATAGGTGTGTTTGTGAACAAT  
TATATTATCACACATACACAACCTCATTTATTATCATAATAATAATAAAT

### SEQ ID NO: 3 (558 п.о.)

#### Промотор тетракетид-синтазы/оливетол-синтазы 2 (OLS2)

AAAAATAAAATTAATAAATTTTTAATTATTAATATCATTTTATTTTTTAA  
TAAATAAATATCATTTTTATATTATTATAAATATGTATAAAGTTTTAATTG  
TATACAAGAAGTCTTATAGTAAGAGTATACACCTTACATCATAATAACTA  
CTCGATCTGAAATCAATGGTCAAGAAAAGTTCCCTACCGGTAGGAAACTT  
TTGCTAGATCCTACCATAGTCTTCCCTTATATTTATTATGTAGAATCTAT  
TATTATATCTAATAATTAACAAATATTAACAAATCATTTTGAAAAATTAT  
ATTAACAAAAAACTTGAAAAGTCAAAGATTAACCATCAATTTGCCAAAT  
CAAATTAGTGAGAAAGTAGGTATTATATACCTAACACTCATTTTACATAT  
GTCTAGACGTTTATATGTATAGCGTTGTTGTGTGTAATAAGTTCACTTGT  
AGTATCTTGTACATACATAATATATATATATATAGGTGTGTTTGTGAACA  
ATTATATTATCACACATACACAACCTCATTTATTATTAGCATAATAATAATA  
ATAATAAT

### SEQ ID NO: 4 (1158 п.о.)

## ОПС (открытая рамка считывания) оливетол-синтазы (OLS)

1 atgaatcatc ttcgtgctga ggggtccggcc tccgttctcg ccattggcac cgccaatccg  
61 gagaacattht tattacaaga tgagtttcct gactactatt ttcgcgtcac caaaagtga  
121 cacatgactc aactcaaaga aaagtttcga aaaatatgtg acaaaagtat gataaggaaa  
181 cgtaactgtht tcttaaatga agaacaccta aagcaaaacc caagattggt ggagcacgag  
241 atgcaaactc tggatgcacg tcaagacatg ttggtagttg aggttccaaa acttggaag  
301 gatgcttgtht caaaggccat caaagaatgg ggtcaacca agtctaaaat cactcattta  
361 atcttcaacta gcgcatcaac cactgacatg cccggtgcag actaccattg cgctaagctt  
421 ctcggaactga gtccctcagt gaagcgtgtg atgatgtatc aactaggctg ttatggtggt  
481 ggaaccgtht tacgcattgc caaggacata gcagagaata acaaaggcgc acgagttctc  
541 gccgtgtgtht gtgacataat ggcttgcttg tttcgtgggc cttcagagtc tgacctcgaa  
601 ttactagtgg gacaagctat ctttggtgat ggggctgctg cggtgattgt tggagctgaa  
661 cccgatgagt cagttgggga aaggccgata tttgagttgg tgtcaactgg gcaaacaatc  
721 ttaccaaact cggaaggaa ctttggggga catataaggg aagcaggact gatatttgat  
781 ttacataagg atgtgcctat gttgatctct aataatattg agaaatgttt gattgaggca  
841 tttactccta ttgggattag tgattggaac tccatattht ggattacaca cccagggtggg  
901 aaagctattht tggacaaagt ggaggagaag ttgcatctaa agagtgataa gtttggtgat  
961 tcacgtcatg tgctgagtht gcatgggaat atgtctagct caactgtctt gtttgtht  
1021 gatgagtht ggaagaggtc gttggaggaa gggaagtcta ccactggaga tggatttgag  
1081 tggggtgtht tttttgggtt tggaccaggt ttgactgtcg aaagagtgg cgtgcgtagt  
1141 gttcccatca aatattaa

**SEQ ID NO: 5 (996 п.о.)**

**Промотор циклазы оливетоловой кислоты (ОАС)**

AATTTTTGACAATTTTTTTTTTAATATAACTTAACCTTGAAGATAATTCCTAAT  
ACGAATAAATACAGAAAATATAAACAGTTTTGTTATAACACTTTTAGATC  
AGATTATAATTAAATTTTTATATTTTTTGATAAAAAAATCAATTGAGGGTCC  
TATTTGTACCATTTTAGAAAAATATAGTGTCCATTTTTATTATTTAGTAAA  
ACAGAGAGTCTAATGCGTAACTTTTACAAAAATACATGGTCCAAAATAGT  
ATTTACCCTTTAATTTTTATTAGCAACTGTCCCAAAAAAATATGTTTTGA  
TGACTGACGTACGGGAATGTAAAGTTTTGTAATAGTGTATTGATTCAAAG  
ACAACATAAAGACATCAATCTGAAATCGATTTCAATGTCCCAAAAACACA  
TTAATGAGCCTTAATTGCATCCGATAATCATTTTCCATTGGTTTTATTAC  
TTCTCATATATATAGACATCACATATATGATAGGATTTCTTGAGAATAAT  
GTTAACATTGAGATTTTTATTACAACCTGATATATTGATTATGCTTAGATG  
GCTTGAATTTGAGCGACATATATAGAAAGAGTATAGAATGATATATATGC  
ACATCCAAAATATGTACCAAAATATTAGGTGACAATTTAGATAAATGGAA  
GAGAAAATTATAGAAAAATGAGGGTTTATATTTTTGTGGTTATTTAATTT  
TAGACATAGTGTGATCCAATAATTTAGGATGTATAATTGTTAGGCACAT  
GGATTACTTGTTTTTTTTATTAAGTATAACCTTACAAAGTAGATGGTAGTA  
ATTAATGTAGAAGGTTCCAATAATGTATTTATATAAATTGTTAGGCATGC  
AAAGCCTAATTAATTAATAAATGAGGGTGGCCAATGGCCACTATATATAT  
CAAGGCATCGACTGTATGTAGCATAATGTGATTTATATAATTATCAAAAA  
AAAAAAATAAAAAATAAGAAGAAGAAAGTTGAGAAAGACCATGG

**SEQ ID NO: 6 (992 п.о.)**

**Промотор циклазы оливетоловой кислоты 1 (ОАС1)**

AATTTTTGACAATTTTTTTTTTAATATAACTTAACCTTGAAGATAATTCCTAAT  
ACGAATAAATACAGAAAATATAAACAGTTTTGTTATAACACTTTTAGATC  
AGATTATAATTAAATTTTTATATTTTTTGATAAAAAAATCAATTGAGGGTCC  
TATTTGTACCATTTTAGAAAAATATAGTGTCCATTTTTATTATTTAGTAAA  
ACAGAGAGTCTAATGCGTAACTTTTACAAAAATACATGGTCCAAAATAGT  
ATTTACCCTTTAATTTTTATTAGCAACTGTCCCAAAAAAATATGTTTTGA  
TGACTGACGTACGGGAATGTAAAGTTTTGTAATAGTGTATTGATTCAAAG  
ACAACATAAAGACATCAATCTGAAATCGATTTCAATGTCCCAAAAACACA  
TTAATGAGCCTTAATTGCATCCGATAATCATTTTCCATTGGTTTTATTAC  
TTCTCATATATATAGACATCACATATATGATAGGATTTCTTGAGAATAAT  
GTTAACATTGAGATTTTTATTACAACCTGATATATTGATTATGCTTAGATG  
GCTTGAATTTGAGCGACATATATAGAAAGAGTATAGAATGATATATATGC  
ACATCCAAAATATGTACCAAAATATTAGGTGACAATTTAGATAAATGGAA  
GAGAAAATTATAGAAAAATGAGGGTTTATATTTTTGTGGTTATTTAATTT  
TAGACATAGTGTGATCCAATAATTTAGGATGTATAATTGTTAGGCACAT  
GGATTACTTGTTTTTTTTATTAAGTATAACCTTACAAAGTAGATGGTAGTA  
ATTAATGTAGAAGGTTCCAATAATGTATTTATATAAATTGTTAGGCATGC  
AAAGCCTAATTAATTAATAAATGAGGGTGGCCAATGGCCACTATATATAT  
CAAGGCATCGACTGTATGTAGCATAATGTGATTTATATAATTATCAAAAA  
AAAAAAATAAAAAATAAGAAGAAGAAAGTTGAGAAAGAGA

**SEQ ID NO: 7 (485 п.о.)**

**ОРС циклазы оливетоловой кислоты (ОАС)**

```
1 aaaaaagaag aagaagaaga aagttgagaa agagaatggc agtgaagcat ttgattgtat
61 tgaagttcaa agatgaaatc acagaagccc aaaaggaaga atttttcaag acgtatgtga
121 atcttgtgaa tatcatccca gccatgaaag atgtatactg gggtaaagat gtgactcaaa
181 agaataagga agaagggtag actcacatag ttgaggtaac atttgagagt gtggagacta
241 ttcaggacta cattattcat cctgcccattg ttggatttgg agatgtctat cgttctttct
301 gggaaaaaact tctcatTTTT gactacacac cacgaaagta gactatatat agtagccgac
361 caagctgcct tcatcttcat cttctcaaat aatatatcta atatctaatt atataataat
421 aactacttaa taaaagactg tgtttataac attaaataat aataataata aagtcttttg
481 tagct
```

**SEQ ID NO: 8 (1361 п.о.)****Промотор ароматической пренилтрансферазы (PT)**

TCAAACCAGATTTTTTATAATAATTT  
ACACACCAATTAACTAAGAAATTCCTAACTAGAGTTAGTGTTGAATTAGAA  
GGAGTATCAAGGTAACCTATCTCCTTTGTCTCTTTAAATTTTTAAAAGAA  
AAGCTaTTGTTGTAATTAGTTTGGATTTTATGGGTTAGGTTTTGTAGAGT  
TTGTTTGAGCTTAAAATTGTTGTTGGTTTGATTTAAGGTTGAATTCTGTG  
TTGGTTTGTAAAGATTTTAGCTGATGTAGTTCGTGTTGGAGGAGTTCGAGT  
TTTTGAACTCAAAGTCCACTCAACAATATGGTGAAATTAGTTTTAGGTGG  
TTTTAGATGCTTTTGAAGTGTATGTTTTGTTTAGATTACCCTCTTTTTGG  
TAAGTTTGATAGCCTTTGGTCAAGGAATGACTTAATTTGAAGGTCTGAA  
AGTTGAGTAGTTTTGAACTCTTTCTGCCCAAATGGTTTCGAATGAGTT  
GTACTTGTCATATGTGATTTGAGTGGTAAGGTTTCGGAAGGGTAGTCCTAG  
ACAGTGTTTTCAATGATTAGGTTTGGGGTTGGTGAATCTAGAGTTAAGAG  
CCTAGAGTTTTGGTTGCTTGGATTGGTGTGACCTGGTTGTTAGTATCCTT  
ATCAAGGGATCCCGAATAGGTGATGAGTGAGGTTTGGATGGTATATTCTG  
GATCAAAATTTTTAGATGGGGTCCAACTGATAGTTTCAAAAATGTGTGT  
GTGTGTCTGGTTAAGGATTTATTTTGGGAAGGCTCTAGTTGGGAGGTCCT  
GGATTGGAAGTTCTAGATGTGAGGCTCCGGGTAGGAGGGTCCTGTAGGAA  
GATTCTAGATGGTATTTGGTGGTCGAGATGAGGGATTTCCGAACATGTTT  
TAATAGTTACAATAATTCATAAATTTTCAACACTAAATCAAAATATTAAT  
TTTGATATGATTGTATAAATTTAATCTCATCGTAGTGTAGAGCTCTACAT  
GCATGCATGGTTTGTATAGCCATAATTAATTAATTAGGCAAGAAAGATAG  
ATGTGCCTACCATGCATGACTTCTAAAACATGGATGACTTTAAATTTTGA  
AACCAAGCAAAAATTGTTTTACTATAAATCTTGTTAATTTTTTCATTATTG  
ATATCACTATGTTATTCTAACCCCTTTCGTAGCCATAATTAGTTAATTAGG  
CAAGAAAGATAGATGTGCCTACCATGCATGACTTCTAAAACATGGATGAC  
TTTAAATTTTGAACCAAGCAAAAATTATTTTACTATAAATCTTGTTATT  
TTTTTCATTATTGATATCACTATGTTATTCTAACCCCTTCTTTCCCTCAT  
TTTTCTTAATATTCATCAATAATAATCTCCATGG

**SEQ ID NO: 9 (1357 п.о.)****Промотор ароматической пренилтрансферазы 1 (PT1)**

TCAAACCAGATTTTTTATAATAATTT  
ACACACCAATTAACTAAGAAATTCCTAACTAGAGTTAGTGTTGAATTAGAA  
GGAGTATCAAGGTAACCTATCTCCTTTGTCTCTTTAAATTTTTAAAAGAA  
AAGCTaTTGTTGTAATTAGTTTGGATTTTATGGGTTAGGTTTTGTAGAGT  
TTGTTTGAGCTTAAAATTGTTGTTGGTTTGATTTAAGGTTGAATTCTGTG  
TTGGTTTGTAAAGATTTTAGCTGATGTAGTTCGTGTTGGAGGAGTTCGAGT  
TTTTGAACTCAAAGTCCACTCAACAATATGGTGAAATTAGTTTTAGGTGG  
TTTTAGATGCTTTTGAAGTGTATGTTTTGTTTAGATTACCCTCTTTTTGG  
TAAGTTTGATAGCCTTTGGTCAAGGAATGACTTAATTTGAAGGTCTGAA  
AGTTGAGTAGTTTTGAACTCTTTCTGCCCAAATGGTTTCGAATGAGTT  
GTACTTGTCATATGTGATTTGAGTGGTAAGGTTTCGGAAGGGTAGTCCTAG  
ACAGTGTTTTCAATGATTAGGTTTGGGGTTGGTGAATCTAGAGTTAAGAG  
CCTAGAGTTTTGGTTGCTTGGATTGGTGTGACCTGGTTGTTAGTATCCTT  
ATCAAGGGATCCCGAATAGGTGATGAGTGAGGTTTGGATGGTATATTCTG  
GATCAAAATTTTTAGATGGGGTCCAACTGATAGTTTCAAAAATGTGTGT  
GTGTGTCTGGTTAAGGATTTATTTTGGGAAGGCTCTAGTTGGGAGGTCCT

GGATTGGAAGTTCTAGATGTGAGGCTCCGGGTAGGAGGGTCCTGTAGGAA  
GATTCTAGATGGTATTTGGTGGTCGAGATGAGGGATTTCCGAACATGTTT  
TAATAGTTACAATAATTCATAAATTTTCAACACTAAATCAAAATATTAAT  
TTTGATATGATTGTATAAATTTAATCTCATCGTAGTGTAGAGCTCTACAT  
GCATGCATGGTTTGTATAGCCATAATTAATTAATTAGGCAAGAAAGATAG  
ATGTGCCTACCATGCATGACTTCTAAAACATGGATGACTTTAAATTTTGA  
AACCAAGCAAAAATTGTTTTACTATAAATCTTGTTAATTTTTTCATTATTG  
ATATCACTATGTTATTCTAACCCTTTCGTAGCCATAATTAGTTAATTAGG  
CAAGAAAGATAGATGTGCCTACCATGCATGACTTCTAAAACATGGATGAC  
TTTAAATTTTGAACCAAGCAAAAATTATTTTACTATAAATCTTGTTATT  
TTTTTCATTATTGATATCACTATGTTATTCTAACCCTTTCCTTCCCTCATT  
TTTTCTTAATATTCAATCAATAATAATCTCC

**SEQ ID NO: 10 (1188 п.о.)**

**ОПС ароматической пренилтрансферазы (PT)**

1 atgggactct catcagtttg taccttttca tttcaaacta attaccatac tttattaaat  
61 cctcacataa ataatcccaa aacctcatta ttatgttatc gacaccccaa aacaccaatt  
121 aaatactctt acaataattht tccctctaaa cattgctcca ccaagagtht tcatctacaa  
181 aacaaatgct cagaatcatt atcaatcgca aaaaattcca ttagggcagc tactacaaat  
241 caaactgagc ctccagaatc tgataatcat tcagtagcaa ctaaaatttht aaactttggg  
301 aaggcatgtht ggaaacttca aagaccatat acaatcatag catttacttc atgcgcttgt  
361 ggattgtttg ggaaagagtht gttgcataac acaaatthta taagttggtht tctgatgttc  
421 aaggcattct tttttttggg ggctatatta tgcattgctt cttttacaac taccatcaat  
481 cagattttacg atcttcacat tgacagaata aacaagcctg atctaccact agcttcaggg  
541 gaaatatcag taaacacagc ttggattatg agcataattg tggcactgtht tggattgata  
601 ataactataa aaatgaaggg tggaccactc tatatattht gctactgtht tggatthttt  
661 ggtgggattg tctattctgt tccaccattt agatggaagc aaaatccttc cactgcattt  
721 cttctcaatt tcctggccca tattattaca aatttcacat tttattatgc cagcagagca  
781 gctcttggcc taccatttga gttgaggcct tcttttactt tcctgctagc atttatgaaa  
841 tcaatgggtht cagctttggc tttaatcaaa gatgcttcag acgttgaagg cgacactaaa  
901 tttggcatat caaccttggc aagtaaatat ggttccagaa acttgacatt atthtgttct  
961 ggaattgttc tcctatccta tgtggctgct atacttgctg ggattatctg gccccaggct  
1021 ttcaacagta acgtaatgtht actttctcat gcaatcttag cattttgtht aatcctccag  
1081 actcgagatt ttgcgttaac aaattacgac ccggaagcag gcagaagatt ttacgagtht  
1141 atgtggaagc tttattatgc tgaatattht gtatatgtht tcatataa

**SEQ ID NO: 11 (805 п.о.)****Промотор гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1)**

ATAATGTTATTTATTATTTAATACAATATGACATTTATACAGCGTACCAA  
ACGAGCCCATAATGTATTGCAATTGTATTGTTGTACGAATTAAAATAATA  
AAATACTAATTAAGTTAATATTGTAAGATAGATAATATGGCAAACAAATA  
AATAATTTTTCAGTTGAGAATATGTACAAAATTAAAGTTGATTTTACAAGA  
AACAAGTAGTACTAATTAAAATGGTAGATTTACATATAGTGTTTCGTTAAA  
TTTGAAAAAAGAAAACGACTAATTCATTGGAAAATTGATTGTGGAAGAAA  
TCAAAATTTGGTGGCTGAACCGCCCTAGTTACTTAACACAATTCATAAAA  
CAACCCCTACACTACTTACCCTACACTATATACGTATATTTTTTTTTTTATA  
TTCCATTTGTTAATAAAAATAAATATGCATTGTTATTATGTGTACCAAGAT  
GCTAATACGGTGACGTTTTATATAAGTTTATAATTTTTTTATTAAAGTAAA  
ACAATTGTC CCTCAATATTAATTAAGAAAATAAGTAGGTTTTAGCATTT  
TCTCATGATAAATAAGTAGGAGTAGTAAGTATATTAATTTATATGCATAT  
GTTAAAAGGCAACACAGTGATAGGTTGTGTAGTACGTACCCAAACCAAAT  
TCCAGCCTAATCCATTATTAATGAGCAAGTCCTTGATAAAAATAAGGTGCA  
TGTTGTTAGATCAAATAACCCGTCCCGAAATCCAATATATATATATATAT  
AATATTCAAACTCTCTCTTTCTATCTTCGTACAATTTAATAGAAGTAACC  
ATGGG

**SEQ ID NO: 12 (800 п.о.)****Промотор гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1')**

ATAATGTTATTTATTATTTAATACAATATGACATTTATACAGCGTACCAA  
ACGAGCCCATAATGTATTGCAATTGTATTGTTGTACGAATTAAAATAATA  
AAATACTAATTAAGTTAATATTGTAAGATAGATAATATGGCAAACAAATA  
AATAATTTTTCAGTTGAGAATATGTACAAAATTAAAGTTGATTTTACAAGA  
AACAAGTAGTACTAATTAAAATGGTAGATTTACATATAGTGTTTCGTTAAA  
TTTGAAAAAAGAAAACGACTAATTCATTGGAAAATTGATTGTGGAAGAAA  
TCAAAATTTGGTGGCTGAACCGCCCTAGTTACTTAACACAATTCATAAAA  
CAACCCCTACACTACTTACCCTACACTATATACGTATATTTTTTTTTTTATA  
TTCCATTTGTTAATAAAAATAAATATGCATTGTTATTATGTGTACCAAGAT  
GCTAATACGGTGACGTTTTATATAAGTTTATAATTTTTTTATTAAAGTAAA  
ACAATTGTC CCTCAATATTAATTAAGAAAATAAGTAGGTTTTAGCATTT  
TCTCATGATAAATAAGTAGGAGTAGTAAGTATATTAATTTATATGCATAT  
GTTAAAAGGCAACACAGTGATAGGTTGTGTAGTACGTACCCAAACCAAAT  
TCCAGCCTAATCCATTATTAATGAGCAAGTCCTTGATAAAAATAAGGTGCA  
TGTTGTTAGATCAAATAACCCGTCCCGAAATCCAATATATATATATATAT  
AATATTCAAACTCTCTCTTTCTATCTTCGTACAATTTAATAGAAGTAATA

**SEQ ID NO: 13 (1000 п.о.)****Промотор гексаноил-КоА-синтетазы (AAE3)**

TAAAAATTAGATTATATTTTTATCAGAATTTTTTATTATATTTTTTCATC  
GAGTTACGTTGATTTAACGTATGTTGACGGTGCTTATAATTGTCTATTAT  
TTTTAAGTTATATACACGCACTACTTACGTAAATTTAGTTGGCAGATTTT  
CTGTCTCTATGGGCTATATTGTTGGACATCAGCTATCTCATTAATTAATA  
ATACCATACTTTTTCTTAAAAGTTAAATAAAAACAAAATTATACACGCACT  
GATTTCGAATGGTGTAGCCACGCACTTGCTAAGTCTGTTACTAGTTCTGT  
AGGAGTTAATGTGTGGACTGATGCTTGTCTAGATTTTATCAGCTATCTC  
ATTAATTAATAATACCATACTTTTTCTTAAAAGTTAAATAAAAACAAAATT

ATACACGCACTACGATAAGGATTATATAAATGATTAACATAAAAAATATCT  
ATTTAACATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGG  
GATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGT  
AGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAA  
GGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCA  
CGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCA  
TCGGTGATGTCTGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGT  
GATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGC  
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCC  
CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAACA  
CCACCACCACCACCACCACCGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGTTCCCATG  
ATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTATGGAG

**SEQ ID NO: 14 (869 п.о.)**

**Промотор гексаноил-КоА-синтетазы (AAE12)**

GTGACAAACTGAAGAATTCTGTTTATTTTATTTTATACATT  
AGTGATGTTTTTTACTTTTTTAGAGTTATTTTTATGCCTATGTAATTTGC  
ATATTGTAGTGGAGTTTATGCAGTTATTTTTTTGTTGTTATTTAGTTGTT  
TAACTAAGAGAAATAAATATATATATTTTTTTATTTGTGCGTTGTTTTTAT  
TTTATTTTTTTAAGTTGACGTAAGTGTTGATGCTCAATTAATTTTTTATATT  
AACATAAAATTGTTATTGTGTTGCTTATTCGTTGCTATTGAGTTATTTCA  
ATATTGTACTTTTTGAAGTTTTTGTCTTATAAATTTATTTTTATTTGCAT  
AACATATGATAAACTTTAATGGATTTATATGTTACGGTTAAGTTGTTTTTC  
TAGTTGCTTTTTGTGTTGTTGTTTAGTTGTTTTGCGCTGAGAAAAGAAGCC  
CTATACGTTAAAATTCACTTTGTCCGAATTCGCCACGTGGCAACTACTGC  
TACGTTCTGACGCTACAGATTGTGAGCGTCAGGCAAGTCTGAATGCTTTG  
TCCCGCACTCACGTGTGAGTCTCACTCGCCACATAGCCATATGTGTGCC  
ACACATCTCCTTGCGCATCTAGGGGAGTTTTTCTACTGTATTTTTGTAAA  
TAAGAACTTTGAAAATAGTATATTTGAAATTAATAAATAATATAAATGT  
TTATTTTTACTTATAGTAGTATAAATATTTATTTAAGATAATTTTAACTT  
AAAATAGAAAAAATCTCAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
AATTTTTATATTTATGAAAATTTCCCGTATAAAAGGGAAGATTTTTTTTT  
TTAAAATTAGTAGGTAAGTAATAGGATG

**SEQ ID NO: 15 (2351 п.о.)****ОРС гексаноил-КоА-синтетазы (AAE1-1)**

1 tcttggagtg tatatataga tatatatata catttctcca tttttggcca cccaaattac  
61 ctaaattgaa ttcgtcgtgt tcgtctttct ccgccataaa taacaattga tttccttcgt  
121 tctttcaagt ttttgtcaac tgagtactga gatccagtct gagtcgacac ttgtagaggt  
181 tcgaaaatgg cgcagaagaa gtttattttt gaggttgaaa aggctaagga agctaaggat  
241 ggaaggcctt ccatgggacc tgtttatcga agtatgtacg ccaaggatgg ctttcctcct  
301 ccgattgatg gattggattg ttgttgggat gtgttttaggc tttctgtgga gagaaatcct  
361 ggaacaacaaa tgctcggtcg ccgggagggt gtggatggga aggctggaaa gtatgtttgg  
421 caaacttata aggaggttta tgattgtgtg ataaaacttg gaaatgccat gcgcagttgt  
481 ggtttcggag aaggagacaa atgtggtatc tatggtgcc aattgctctga atggattatg  
541 agcatgcagg cttgcaatgc tcatggactc tattgtgttc cgttgatga caccttaggt  
601 gctaattgaa ttgagtttgt cataaaacat gccgaggtta caattgcttt tgcagaagag  
661 aaaaagcttc ctgagctgtt gaaaacactt cctaacacca cagactattt aaaaacactt  
721 gtgagctttg ggaaggtcac accggaacaa agggaatctg ttgaaaagt tggattgaag  
781 atctattcct gggaagaggt cttgcaattg ggtgattgta aagatttcga tcttcagtg  
841 aaaaagaaaa ctgatatatg cactataatg tatactagtg gaactactgg tgacccaaag  
901 ggagtactga tatccaatga gagcatcatt tctcttttgg ctggggtgag gcgattgctt  
961 gagagtgtaa atgaaaagt gaccgagaaa gatgtatttc tttcatatct tccccttgca  
1021 catatcttcg atcgggtgat tgaggagtta tttattttgc atggtgcctc aatcgggttc  
1081 tggcgtggcg atgtcaaatt attacttgaa gacattgggg agctaaaacc aactattttc  
1141 tgtgcggttc ccggtgtgct ggatagagtc tatgctggtt tgacgcagaa gatttctgct  
1201 gggggattct taaagaagac tctcttcaat ttcgcatact cacgcaagta taataacatg  
1261 cgaaaggggc ttaaacacgg ggacgcagct ccattatgtg acaaaattgt atttagtaag  
1321 gtgaagcaag gtttgggagg taatgtgcgg cttattctgt ctggagctgc gcctctagct  
1381 cctcatgttg aagcttactt acgagttgtg acatgtgctc atgtttgcca aggatatggg  
1441 ctaactgaaa cttgtgcggg gacatttgtc tcgataccaa atgaactacc aatgctcggg  
1501 acagttggtc ctccagtacc caatgttgat gtatgtctgg aatcagttcc ggaaatggga  
1561 tatgatgcc ttgcagaagt accgcgtgga gaagtatgtg tgaagggaag caccttattc  
1621 tctgggtact acaaacgtga agacttaacc aaggaggtca tgattgatgg gtggttccat  
1681 acaggtgatg ttggtgagtg gcaagcagat ggaagcttga aaatcattga ccgtaagaaa  
1741 aatattttca aactttctca aggagaatat gtggcagttg agaacttaga gaacatttat  
1801 ggtcttggtt ctgacattga ctcaatatgg gtttacggga acagcttcga gtccttcctc  
1861 gttgctgtga ttaacccgaa ccagcaagca cttgaacgtt gggccggaga gaataatata  
1921 tctggtgact tcaagtccat ttgtgaaaat ccaagagcaa aggaatacat tttgggagag  
1981 ctcaataaga ttggcaaaga gaaaaagttg aaaggttttg agttcataag agctgttcac  
2041 cttgaccagc aggcatattg catagaacgt gaccttatta ctccaacata taagaaaaag  
2101 agacccagc tgctcaaata ctaccagagt gttattgata acatgtacaa ggaaggaaac  
2161 aagcccagga cctgaaagat ataatagaca tttagagctt cactttctaa tatttcttca  
2221 cacacttccc attttcatct ctctcttact tattacacta taaataatta acaaggttta  
2281 ctgtgttgta aatgacattt taatatattt atagtctcaa tgtttcaatt cttagaggac  
2341 gttttgattg g

**SEQ ID NO: 16 (420 п.о.)****Промотор CBDA-синтазы (CBDAS)**

GTTAATAAACATACTTGTGAGTAGATCTAAGATCCTGGTAAAATAATTCCCAACATATT  
TCAATCGTAAATTCATGAGTGATTCTTATCACTTCTTAAAAAAAAGATAT  
AAAGATCCATAGATAAATAT TTGCTAGTCC TTTCTTTCCA TAGTCAACTT  
CAATATGGCA TCTTAACTTC TTTCCATCAA CAAATGATGC TCAACTACTT  
AATGTACAAT TTATATTTAT TTTTAGTAAG GGATACACCT AACAAATGATG  
CCTAATTTTG GTGAATTTTT TTTTACCACA TGTGACTTAA TGATATCAAA  
TTTGGAATA TTTAGTTAAT TTATTTGCCC CTGCTCCATT ATATAAAGCT  
ATAAATAGGA TAGTTCTTAA TTCATAGTAA TTCAAAAATT ATTAGAACTA  
AAGAACCATG G

**SEQ ID NO: 17 (416 п.о.)****Промотор CBDA-синтазы 1 (CBDAS1)**

GTTAATAAACATACTTGTGAGTAGATCTAAGATCCTGGTAAAATAATTCCCAACATATT  
TCAATCGTAAATTCATGAGTGATTCTTATCACTTCTTAAAAAAAAGATAT  
AAAGATCCATAGATAAATAT TTGCTAGTCC TTTCTTTCCA TAGTCAACTT  
CAATATGGCA TCTTAACTTC TTTCCATCAA CAAATGATGC TCAACTACTT  
AATGTACAAT TTATATTTAT TTTTAGTAAG GGATACACCT AACAAATGATG  
CCTAATTTTG GTGAATTTTT TTTTACCACA TGTGACTTAA TGATATCAAA  
TTTGGAATA TTTAGTTAAT TTATTTGCCC CTGCTCCATT ATATAAAGCT  
ATAAATAGGA TAGTTCTTAA TTCATAGTAA TTCAAAAATT ATTAGAACTA  
AAGAAAA

**SEQ ID NO: 18 (535 п.о.)****Промотор CBDA-синтазы (CBDAS) 20800**

AGACGTT ATAGCTTTATTGTCTAAATT TCTTGGGGTA GTTTTGTCCC ATGTTGCTCG  
CTTACTTTAGAAAGTTCAAAG TTTGACAAAA CATGCTATTC GGTATACAA  
TGAGCTATCC  
TAGTTCAAGG AGATTCCTGT GCTATTTGTG GATGTCTACA TTGTAAATTC  
ATGAGTGATT CTTATAACTT TATTAAAAAA AAGACAAATA GATCCATAGA  
TAAATATTTG CAAGTGCTTT CTTGTCATAG CAATTTTTTTT TTACATAGGT  
AATTTAAAAA ATTCATCTTA ACTTTTTTTC ATCAATAAAT GATGCTCAAT  
TATTCAATGC ACCATGTACA TTTATTTTTA ATAAGGGCTG CACCTAACAA  
AGGTGCCTAA TTTTGGTAAA AAAGAAATTA CGGCATGTGA ATATTTAATG  
AGCATCAAAT TACAAAATAT TTAGCTAATT TCTTTACCCC CACTCCAATC  
TATAAAGCTA TAAATAGGAT AATTTTCCAT TCATAGTAAT TTCCAACATT  
ACGACTAAAG AACCATGG

**SEQ ID NO: 19 (531 п.о.)****Промотор CBDA-синтазы (CBDAS) 20800'**

AGACGTT ATAGCTTTATTGTCTAAATT TCTTGGGGTA GTTTTGTCCC ATGTTGCTCG  
CTTACTTTAGAAAGTTCAAAG TTTGACAAAA CATGCTATTC GGTATACAA  
TGAGCTATCC  
TAGTTCAAGG AGATTCCTGT GCTATTTGTG GATGTCTACA TTGTAAATTC  
ATGAGTGATT CTTATAACTT TATTAAAAAA AAGACAAATA GATCCATAGA  
TAAATATTTG CAAGTGCTTT CTTGTCATAG CAATTTTTTTT TTACATAGGT

AATTTAAAAA ATTCATCTTA ACTTTTTTTC ATCAATAAAT GATGCTCAAT  
 TATTCAATGC ACCATGTACA TTTATTTTTA ATAAGGGCTG CACCTAACAA  
 AGGTGCCTAA TTTTGGTAAA AAAGAAATTA CGGCATGTGA ATATTTAATG  
 AGCATCAAAT TACAAAATAT TTAGCTAATT TCTTTACCCC CACTCCAATC  
 TATAAAGCTA TAAATAGGAT AATTTTCCAT TCATAGTAAT TTCCAACATT  
 ACGACTAAAG AAAA

**SEQ ID NO: 20 (1635 п.о.)**

**OPC CBDA-синтазы (CBDAS)**

1 atgaagtgct caacattctc cttttggttt gtttgcaaga taatattttt ctttttctca  
 61 ttcaatatcc aaacttccat tgctaatacct cgagaaaact tccttaaagt cttctcgcaa  
 121 tatattccca ataatgcaac aaatctaaaa ctcgatatata ctcaaaacaa cccattgtat  
 181 atgtctgtcc taaattcgac aatacacaaat cttagattca cctctgacac aacccccaaa  
 241 ccacttggtta tcgtcactcc ttcacatgtc tctcatatcc aaggcactat tctatgctcc  
 301 aagaaagttg gcttgcagat tcgaactcga agtgggtggtc atgattctga gggcatgtcc  
 361 tacatatctc aagtcccatt tggtatagta gacttgagaa acatgcgttc aatcaaaata  
 421 gatgttcata gccaaactgc atgggttgaa gccggagcta cccttgagaa agtttattat  
 481 tgggttaaatg agaaaaatga gaatcttagt ttggcggctg ggtattgccc tactgtttgc  
 541 gcagggtggac actttggtgg agggagctat ggaccattga tgagaaacta tggcctcgcg  
 601 gctgataata tcattgatgc acacttagtc aacgttcatg gaaaagtgtc agatcgaaaa  
 661 tctatggggg aagatctctt ttgggcttta cgtggtggtg gagcagaaag cttcggaatc  
 721 attgtagcat ggaaaattag actggttgct gtcccaaagt ctactatggt tagtgtaa  
 781 aagatcatgg agatacatga gcttgtcaag ttagttaaca aatggcaaaa tattgcttac  
 841 aagtatgaca aagatttatt actcatgact cacttcataa ctaggaacat tacagataat  
 901 caagggaaga ataagacagc aatacacact tacttctctt cagttttcct tgggtggagt  
 961 gatagtctag tcgacttgat gaacaagagt tttcctgagt tgggtattaa aaaaacggat  
 1021 tgcagacaat tgagctggat tgatactatc atcttctata gtggtgttgt aaattacgac  
 1081 actgataatt ttaacaagga aattttgctt gatagatccg ctgggcagaa cgggtgcttc  
 1141 aagattaagt tagactacgt taagaaacca attccagaat ctgtatttgt ccaaattttg  
 1201 gaaaaattat atgaagaaga tataggagct gggatgtatg cgttgtaccc ttacggtggt  
 1261 ataattggatg agatttcaga atcagcaatt ccattccctc atcgagctgg aatcttgtat  
 1321 gagttatggt acatatgtag ttgggagaag caagaagata acgaaaagca tctaaactgg  
 1381 attagaaata tttataactt catgactcct tatgtgtcca aaaatccaag attggcatat  
 1441 ctcaattata gagaccttga tataggaata aatgatccca agaatccaaa taattacaca  
 1501 caagcacgta tttggggtga gaagtatttt ggtaaaaatt ttgacaggct agtaaaagt  
 1561 aaaaccctgg ttgatcccaa taactttttt agaaacgaac aaagcatccc acctcttcca  
 1621 cggcatcgtc attaa

**SEQ ID NO: 21 (800 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 19603**

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| СТТАСАС    | АТТССС     | ААСТТАААА  | ААТТАСААТТ | АТТАТГАААГ |
| АСГГСААА   | ААГСААТТА  | АТТАССТААТ | СГТАААТААА | АГАААТТТТА |
| САТАААТАТА | ТТАТАТААТТ | ТТАТАТТАТТ | САТААААААТ | АТААААТАГТ |
| АТТАГАС    | АТТГАГАТТТ | ГАТТССГАА  | ТАААААТТАА | ТТТСТТТААТ |
| ГТААААТТТТ | АААААСАААТ | ТАТТААААСС | СГТГАААГ   | СГАТСТАТТ  |
| ССТАГАТТА  | АТААТАААГТ | АГАТАГАТА  | ГГАГГТАГА  | АТТТАТААТТ |
| ТТТСАТТАА  | АТАТТТГААТ | ТТАСТТТАСТ | ГТТСТТТГТТ | АТТСТТСАТТ |
| ТААТТТТГСТ | АТТТГТТАТТ | ТТАСТТТТТА | ААААТТАТАА | ТТТТААТТАС |
| САААТААААА | ГТААААТАГА | ТАТТГГТАСТ | ТГАТАТТТАС | ТСТТТАТГГГ |
| ААССАТААТА | ААСТАТАААА | ГТАТТАТГТ  | ГТАСТТГТА  | ССАТАГГСАС |
| СТАТАТССА  | САААСТАГСТ | АССАТАГССА | АТТТСТТГТТ | ТТТТГТТТСС |
| ААТАТССААТ | ТТТТАТТГАТ | ГССАААСТАТ | ТСААТГТАСА | АТГТАСАТТТ |
| АТТТТТААТА | АГГГСТТТАС | СТААСАААГГ | ТГСТТААТТТ | ТАГТТГАТТТ |
| АТТТТТТАТ  | АСАТГТАСТ  | АТТТААТГАС | ТАТСАААТТА | ТААААТАТТТ |
| ААГТААТТТ  | АТТТГССССА | АСТССААТАТ | АТААТАТТАТ | АААТАГГАТА |
| ГТТСТСААТТ | ССТААТААТТ | СААААААТТА | ТТАГГАС    | АГААССАТГГ |

**SEQ ID NO: 22 (796 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 19603'**

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| СТТАСАС    | АТТССС     | ААСТТАААА  | ААТТАСААТТ | АТТАТГАААГ |
| АСГГСААА   | ААГСААТТА  | АТТАССТААТ | СГТАААТААА | АГАААТТТТА |
| САТАААТАТА | ТТАТАТААТТ | ТТАТАТТАТТ | САТААААААТ | АТААААТАГТ |
| АТТАГАС    | АТТГАГАТТТ | ГАТТССГАА  | ТАААААТТАА | ТТТСТТТААТ |
| ГТААААТТТТ | АААААСАААТ | ТАТТААААСС | СГТГАААГ   | СГАТСТАТТ  |
| ССТАГАТТА  | АТААТАААГТ | АГАТАГАТА  | ГГАГГТАГА  | АТТТАТААТТ |
| ТТТСАТТАА  | АТАТТТГААТ | ТТАСТТТАСТ | ГТТСТТТГТТ | АТТСТТСАТТ |
| ТААТТТТГСТ | АТТТГТТАТТ | ТТАСТТТТТА | ААААТТАТАА | ТТТТААТТАС |
| САААТААААА | ГТААААТАГА | ТАТТГГТАСТ | ТГАТАТТТАС | ТСТТТАТГГГ |
| ААССАТААТА | ААСТАТАААА | ГТАТТАТГТ  | ГТАСТТГТА  | ССАТАГГСАС |
| СТАТАТССА  | САААСТАГСТ | АССАТАГССА | АТТТСТТГТТ | ТТТТГТТТСС |
| ААТАТССААТ | ТТТТАТТГАТ | ГССАААСТАТ | ТСААТГТАСА | АТГТАСАТТТ |
| АТТТТТААТА | АГГГСТТТАС | СТААСАААГГ | ТГСТТААТТТ | ТАГТТГАТТТ |
| АТТТТТТАТ  | АСАТГТАСТ  | АТТТААТГАС | ТАТСАААТТА | ТААААТАТТТ |
| ААГТААТТТ  | АТТТГССССА | АСТССААТАТ | АТААТАТТАТ | АААТАГГАТА |
| ГТТСТСААТТ | ССТААТААТТ | СААААААТТА | ТТАГГАС    | АГАААА     |

**SEQ ID NO: 23 (796 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 50320**

|            |            |            |            |             |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| TTATTTAAAT | TTCTCAGAGA | GATATAGAGA | ATTTACAATA | GGTCAAGTTG  |
| TATATTTTTT | AATCCGAATA | ATTAATGCTT | TTGAATATCC | ATCATCAATA  |
| TTGAATAATA | AAGTAGATAG | CAGAGGAGAT | TAGAACTCAT | AATTTTTTCAT |
| TTATATTTTT | GAATTTAGTT | TACTGTTCTT | TATTATTCTT | CATTTAATTT  |
| TGCTATATGT | TATTTTACTT | TTCAAAAATT | CTAATTTTGA | TTACCAAATA  |
| AAAAATAAAA | TATATATTGG | TACTTCATAT | TTAGTTTTTA | TGGGAATGAT  |
| AATGAATGAT | ATTGTAATAA | ACTATAAAAG | TAATTTTGTA | TACTTGCATA  |
| GTTCTTAATT | TTTACCCAAA | AAAATATATA | TTAATGAAAA | AAAAAGGTGG  |
| AAAGTGCCAT | AGGCACCTAT | ATCCCACAAA | CTAGCTATAA | GATATTGAAA  |
| GACAAATAGA | TCCATAGATA | AATATTTGCG | TGTCCTTTCT | TTTCATATCT  |
| AATTTTTTGT | TTTTTTATTT | TTTTCCAATA | GTCAATTTTG | GCAGCTTAAC  |
| TTCTTTCCAT | AAATAATGAT | GCCAAACTAT | TCAATGTAAA | ATTTAGATTT  |
| ATTTTCATTA | AGGGCTTCAC | CTAACAAATG | TGCCTAATTT | TTGTGGATTT  |
| TTTTACCATA | TGTCGCTATT | TAATGACTAC | CAAATTATAG | AATTATTTAA  |
| GTCAATTTCT | CAGTCCCCGC | TCCAATATAT | AAAGTTATAG | AAAGGACAAT  |
| TCTTAATTCA | TAGTAATTCA | AAAATCATTA | AGACTAAAAA | CCATGG      |

**SEQ ID NO: 24 (792 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 50320'**

|            |            |            |            |             |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| TTATTTAAAT | TTCTCAGAGA | GATATAGAGA | ATTTACAATA | GGTCAAGTTG  |
| TATATTTTTT | AATCCGAATA | ATTAATGCTT | TTGAATATCC | ATCATCAATA  |
| TTGAATAATA | AAGTAGATAG | CAGAGGAGAT | TAGAACTCAT | AATTTTTTCAT |
| TTATATTTTT | GAATTTAGTT | TACTGTTCTT | TATTATTCTT | CATTTAATTT  |
| TGCTATATGT | TATTTTACTT | TTCAAAAATT | CTAATTTTGA | TTACCAAATA  |
| AAAAATAAAA | TATATATTGG | TACTTCATAT | TTAGTTTTTA | TGGGAATGAT  |
| AATGAATGAT | ATTGTAATAA | ACTATAAAAG | TAATTTTGTA | TACTTGCATA  |
| GTTCTTAATT | TTTACCCAAA | AAAATATATA | TTAATGAAAA | AAAAAGGTGG  |
| AAAGTGCCAT | AGGCACCTAT | ATCCCACAAA | CTAGCTATAA | GATATTGAAA  |
| GACAAATAGA | TCCATAGATA | AATATTTGCG | TGTCCTTTCT | TTTCATATCT  |
| AATTTTTTGT | TTTTTTATTT | TTTTCCAATA | GTCAATTTTG | GCAGCTTAAC  |
| TTCTTTCCAT | AAATAATGAT | GCCAAACTAT | TCAATGTAAA | ATTTAGATTT  |
| ATTTTCATTA | AGGGCTTCAC | CTAACAAATG | TGCCTAATTT | TTGTGGATTT  |
| TTTTACCATA | TGTCGCTATT | TAATGACTAC | CAAATTATAG | AATTATTTAA  |
| GTCAATTTCT | CAGTCCCCGC | TCCAATATAT | AAAGTTATAG | AAAGGACAAT  |
| TCTTAATTCA | TAGTAATTCA | AAAATCATTA | AGACTAAAAA | AA          |

**SEQ ID NO: 25 (720 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 1330**

```

TTTTCAATTG ATTTAATTTT TTATATTGAT ATAAAGAATT TGCAATACAT
TGAGTTTCTT AACCCGAATA TTAAACGGTT TTGAATATCT TCATCATTGA
TTGAATAATA AAGTGGATAG TAGAGGGAAT TAGAATCCAT AATTTTTTAT
TTATATATTT GAAGTTAGTT TATTATTCTT TGCTATCCTT CATTTAATTT
TGCTATTTGT TATTTTAGTT TCAAAAATTT ATTTTTCATT ACAAATAAAA
AAATAAGATA GGATATTGGT ACTTGATAAG TCTTCTTTGT GGAAACGATA
ATCGGTATTA TTAGGTATAT TTGCATATTT CAATATTATT GCAAAAAATA
AATATATTAA TAAATAAAGT GGAAGGTGCC ATAGGTACCT ATATCCACAA
ACTAGCATAT TGAAAGAAAA TGGATCCAAG GATAAATATT TGCAAGTCTT
TTTTTTTTTG CATAGCCAAT TTCTTTTTTT ATTATTATTT TAATAGAATA
TTTCAAAAGG GCATCTAACA TTTATTTTTTA ATAAGGACTG CACCTAACAA
AGGTGCCTAA TTTTTGTGAA CTTTTTTTTTA CCACATGTGA CTATTTAATG
AGTACTAAAT TATGAAATAT TTAGTTAATT TCTTTGCCCC CGCTCCAATA
TATAATGCTA TAAATAGCAT AATTTTCTAT TCATAGTAAT TCAAAAATCA
TTAGGACTAA AGAACCATGG

```

**SEQ ID NO: 26 (716 п.о.)****Промотор ТНСА-синтазы (THCAS) 1330'**

```

TTTTCAATTG ATTTAATTTT TTATATTGAT ATAAAGAATT TGCAATACAT
TGAGTTTCTT AACCCGAATA TTAAACGGTT TTGAATATCT TCATCATTGA
TTGAATAATA AAGTGGATAG TAGAGGGAAT TAGAATCCAT AATTTTTTAT
TTATATATTT GAAGTTAGTT TATTATTCTT TGCTATCCTT CATTTAATTT
TGCTATTTGT TATTTTAGTT TCAAAAATTT ATTTTTCATT ACAAATAAAA
AAATAAGATA GGATATTGGT ACTTGATAAG TCTTCTTTGT GGAAACGATA
ATCGGTATTA TTAGGTATAT TTGCATATTT CAATATTATT GCAAAAAATA
AATATATTAA TAAATAAAGT GGAAGGTGCC ATAGGTACCT ATATCCACAA
ACTAGCATAT TGAAAGAAAA TGGATCCAAG GATAAATATT TGCAAGTCTT
TTTTTTTTTG CATAGCCAAT TTCTTTTTTT ATTATTATTT TAATAGAATA
TTTCAAAAGG GCATCTAACA TTTATTTTTTA ATAAGGACTG CACCTAACAA
AGGTGCCTAA TTTTTGTGAA CTTTTTTTTTA CCACATGTGA CTATTTAATG
AGTACTAAAT TATGAAATAT TTAGTTAATT TCTTTGCCCC CGCTCCAATA
TATAATGCTA TAAATAGCAT AATTTTCTAT TCATAGTAAT TCAAAAATCA
TTAGGACTAA AGAAAG

```

**SEQ ID NO: 27 (1635 п.о.)****ОРС ТНСА-синтазы (THCAS)**

```

1 atgaattgct cagcattttc cttttggttt gtttgcaaaa taatattttt ctttctctca
61 ttcaatatcc aaatttcaat agctaactct caagaaaact tccttaaatg cttctcggaa
121 tatattctta acaatccagc aaatccaaaa ttcatatata ctcaacacga ccaattgtat
181 atgtctgtcc tgaattcgac aatacaaaat cttagattca cctctgatac aacccccaaa
241 ccactcgtta ttgtcactcc ttcaaatgtc tcccatatcc aggccagtat tctctgctcc
301 aagaaagttg gtttgagat tcgaactcga agcgggtggc atgatgctga gggatgtcc
361 tacatatctc aagtcccatt tggtgtagta gacttgagaa acatgcattc gatcaaaata
421 gatgttcata gccaaactgc gtgggttgaa gccggagcta cccttgaga agtttattat
481 tggatcaatg agaagaatga gaatttttagt tttcctggtg ggtattgccc tactgttggc

```

541 gtaggtggac acttttagtgg aggaggctat ggagcattga tgcgaaatta tggccttgcg  
 601 gctgataata tcattgatgc acacttagtc aatggtgatg gaaaagtctt agatcgaaaa  
 661 tccatgggag aagatctatt ttgggctata cgtgggtggag gaggagaaaa ctttggaatc  
 721 attgcagcat ggaaaatcaa actgggtgtt gtcccatcaa agtctactat attcagtgtt  
 781 aaaaagaaca tggagataca tgggcttgtc aagttattta acaaatggca aaatattgct  
 841 tacaagtatg acaaagatct agtactcatg actcacttca taacaaagaa tattacagat  
 901 aatcatggga agaataagac tacagtacat ggttacttct cttcaatttt tcatgggtgga  
 961 gtggatagtc tagtcgactt gatgaacaag agctttcctg agttgggtat taaaaaaact  
 1021 gattgcaaag aatttagctg gattgataca accatcttct acagtgggtg tgtaaatctt  
 1081 aacactgcta attttaaaaa ggaaattttg cttgatagat cagctgggaa gaagacggct  
 1141 ttctcaatta agttagacta tgttaagaaa ccaattccag aaactgcaat ggtcaaaatt  
 1201 ttggaaaaat tatatgaaga agatgtagga gctgggatgt atgtgttgta cccttacggt  
 1261 ggtataatgg aggagatttc agaatcagca attccattcc ctcatcgagc tggaataatg  
 1321 tatgaacttt ggtacactgc ttcctgggag aagcaagaag ataataaaaa gcatataaac  
 1381 tgggttcgaa gtgtttataa ttttacgact ccttatgtgt cccaaaatcc aagattggcg  
 1441 tatctcaatt atagggacct tgatttagga aaaactaatc ctgagagtcc taataattac  
 1501 acacaagcac gtatttgagg tgaaaagtat tttggtaaaa attttaacag gttagttaag  
 1561 gtgaaaacca aagctgatcc caataatttt tttagaaacg aacaaagtat cccacctctt  
 1621 ccaccgcatc atcat

**SEQ ID NO: 28 (804 п.о.)****Промотор СВСА-синтазы (CBCAS) 3498**

GATAATTTTT CTCCAAATT TAATAGTATC TTTTATATAA GTTCAGTCAT  
GTTTTTCTTA TGTAAGTTAG GCTATTAATT ATTTTGATGT ATTTATTATA  
TTGTATGTCG TTTACTGCAT TCTGCCAACA TTGGTTTTTG TCGATTTATG  
ATATATAATA TGATATGCTG TTAAGTTAGA GGTAAGATTC AATTTATTTA  
AGATTATTTA ATTTGCGCTT TTATTATATA CATCTTCTAG TTGTAATTAA  
TGGGGTAGAA TTAAGACTGT GTTTTGAATT AATATCGGTA TTAGAATAGG  
ATTTGCATGA CTATATTTCT ACCTTACCAA GTTTTTTATC TGATAACACC  
CTTTCACCTA TTATTTTCTT ATTTTAAATT TATTTAT  
ATTTTTACCATATTCTATTTATACTAATCTTAAGTGGTACATTACCTCCCTGTG  
GATACGACATATA  
ATCTGTTTACTATCGTGACCGAAGTATAACTAATTGGGCGACATCACACCTATA  
TCCCACAACTAGCTACTATAGTCAATTTCTTGTTTTTTTTCCAATAGCCAATT  
TTAAATGATGCCAACTATTCAATGTATAATGTACATTTATTTTAAATAAGGGC  
TTCACCTAACAAATGTGCCTAATTTTAGTTAATTTATTTTTTTATCGCATCTTA  
CTATTTAAAGGAACSTATCAAATTATAAAATATTTATGTCAATTCATTTGCCCCA  
ACTCCAATATATAATATTATAAATAGGATAGTTCTCTATTTCATAATAATTCAAA  
ATATCATTAGGACTGAAGAACCATGG

**SEQ ID NO: 29 (800 п.о.)****Промотор СВСА-синтазы (CBCAS) 3498'**

GATAATTTTT CTCCAAATT TAATAGTATC TTTTATATAA GTTCAGTCAT  
GTTTTTCTTA TGTAAGTTAG GCTATTAATT ATTTTGATGT ATTTATTATA  
TTGTATGTCG TTTACTGCAT TCTGCCAACA TTGGTTTTTG TCGATTTATG  
ATATATAATA TGATATGCTG TTAAGTTAGA GGTAAGATTC AATTTATTTA  
AGATTATTTA ATTTGCGCTT TTATTATATA CATCTTCTAG TTGTAATTAA  
TGGGGTAGAA TTAAGACTGT GTTTTGAATT AATATCGGTA TTAGAATAGG  
ATTTGCATGA CTATATTTCT ACCTTACCAA GTTTTTTATC TGATAACACC  
CTTTCACCTA TTATTTTCTT ATTTTAAATT TATTTAT  
ATTTTTACCATATTCTATTTATACTAATCTTAAGTGGTACATTACCTCCCTGTG  
GATACGACATATA  
ATCTGTTTACTATCGTGACCGAAGTATAACTAATTGGGCGACATCACACCTATA  
TCCCACAACTAGCTACTATAGTCAATTTCTTGTTTTTTTTCCAATAGCCAATT  
TTAAATGATGCCAACTATTCAATGTATAATGTACATTTATTTTAAATAAGGGC  
TTCACCTAACAAATGTGCCTAATTTTAGTTAATTTATTTTTTTATCGCATCTTA  
CTATTTAAAGGAACSTATCAAATTATAAAATATTTATGTCAATTCATTTGCCCCA  
ACTCCAATATATAATATTATAAATAGGATAGTTCTCTATTTCATAATAATTCAAA  
ATATCATTAGGACTGAAGAAAA

**SEQ ID NO: 30 (1635 п.о.)****ОПС СВСА-синтазы (CBCAS)**

1 atgaattgct caacattctc cttttgggtt gtttgcaaaa taatatTTTT ctttctctca  
61 ttcaatatcc aaatttcaat agctaactct caagaaaact tccttaaagt cttctcgga  
121 tatattccta acaatccagc aaatccaaaa ttcatatata ctcaacacga ccaattgtat  
181 atgtctgtcc tgaattcgac aatacaaaat cttagattca cctctgatac aacccccaaa  
241 ccactcgtta ttgtcactcc ttcaaatgtc tcccatatcc aggccagtat tctctgctcc

301 aagaaagttg gtttgcagat tcgaactcga agcgggtggcc atgatgctga gggtttgtcc  
 361 tacatatctc aagtccatt tgctatagta gacttgagaa acatgcatac ggtcaaagta  
 421 gatattcata gccaaactgc gtgggttgaa gccggagcta cccttggaga agtttattat  
 481 tggatcaatg agatgaatga gaatthtagt tttcctggtg ggtattgcc tactgttggc  
 541 gtaggtggac acttttagtg aggaggctat ggagcattga tgcgaaatta tggccttgcg  
 601 gctgataata tcattgatgc acacttagtc aatggtgatg gaaaagttct agatcgaaaa  
 661 tccatgggag aagatctatt ttgggctata cgtggtggag gaggagaaaa ctttggaatc  
 721 attgcagcat gtaaaatcaa acttggtgtt gtcccatcaa aggctactat attcagtgtt  
 781 aaaaagaaca tggagataca tgggcttgtc aagttattta acaaaggca aaatattgct  
 841 tacaagtatg acaagattht aatgctcacg actcacttca gaactaggaa tattacagat  
 901 aatcatggga agaataagac tacagtacat ggttacttct cttccatttt tcttgggtgga  
 961 gtggatagtc tagttgactt gatgaacaag agctttcctg agttgggtat taaaaaaact  
 1021 gattgcaaag aattgagctg gattgatata accatcttct acagtgggtg tgtaaattac  
 1081 aacactgcta attttaaaaa ggaaatthtg cttgatagat cagctgggaa gaagacggct  
 1141 ttctcaatta agttagacta tgtaagaaa ctaatacctg aaactgcaat ggtcaaaatt  
 1201 ttggaaaaat tatatgaaga agaggttaga gttgggatgt atgtgttgta cccttacggg  
 1261 ggtataatgg atgagatthc agaatcagca attccattcc ctcatcgagc tgggaataatg  
 1321 tatgaactth ggtacactgc tacctgggag aagcaagaag ataacgaaaa gcatataaac  
 1381 tgggttcgaa gtgtttataa tttcacaact ctttatgtgt cccaaaatcc aagattggcg  
 1441 tatctcaatt atagggacct tgatttagga aaaactaatc ctgagagtcc taataattac  
 1501 acacaagcac gtatthgggg tgaaaagtat thtggtaaaa atthtaacag gttagttaag  
 1561 gtgaaaacca aagctgatcc caataattht thtagaaacg aacaaagtat cccacctctt  
 1621 ccaccgctc atcat

**SEQ ID NO: 31 (171 п.о.)**

**Фрагмент CANON**

atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa  
aggtgcctaatttttgtgaacttttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  
taaaatattttaagtcaattttctttgccccactccaatatataaatgt

**SEQ ID NO: 32 (232 п.о.)**

**Фрагмент CANON с предполагаемым TATA-боксом, 5'-UTR и стартовым кодоном**

atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa  
aggtgcctaatttttgtgaacttttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  
taaaatattttaagtcaattttctttgccccactccaatatataaatgt tataaataggataat  
tctcaattcatagtaattcaaaaatcattaggactaaagaaaaatg

**SEQ ID NO: 33 (709 п.о.)**

**Синтетический промотор из 4-кратного фрагмента CANON**

atgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaa  
aggtgcctaatttttgtgaacttttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaatta  
taaaatattttaagtcaattttctttgccccactccatgatgccaaactatttcaatgtacaat  
gtacattttatttttaataagggcttcacctaacaaaggtgcctaatttttgtgaactttttt  
ttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaatattttaagtcaattttctttgcc  
ccactccatgatgccaaactatttcaatgtacaatgtacattttatttttaataagggcttca  
cctaacaaaggtgcctaatttttgtgaacttttttttaccacatgtgactatttaatgacta  
tcaaattataaaatattttaagtcaattttctttgccccactccatgatgccaaactattcaa  
tgtacaatgtacattttatttttaataagggcttcacctaacaaaggtgcctaatttttgtga  
acttttttttaccacatgtgactatttaatgactatcaaattataaaatattttaagtcaatt  
tctttgccccactccaatatataaatgttataaataggataatttctcaattcatagtaattc  
aaaaatcattaggactaaagaaaaatg

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(для рассмотрения на рег. фазе в ЕАПВ)

1. Синтетическая молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:
  - (a) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29; и
  - (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29, и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичной нуклеиновой кислотой.
2. Вектор экспрессии, содержащий молекулу ДНК по п. 1, функционально связанную с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид.
3. Генетически сконструированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 2.
4. Генетически сконструированная клетка-хозяин по п. 3, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку *Cannabis sativa* или клетку *Nicotiana tabacum*.
5. Генетически сконструированное растение, содержащее клетку, которая содержит химерную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую синтетическую молекулу ДНК по п. 1.
6. Сконструированное растение по п. 5, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой растение *N. tabacum* или растение *C. sativa*.
7. Семена сконструированного растения по любому из пп. 5 – 6, отличающиеся тем, что указанные семена содержат химерную конструкцию нуклеиновой кислоты.

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

- (a) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29; и
- (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29, и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

9. Генетически сконструированное растение по п. 8, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой растение *N. tabacum* или растение *C. sativa*.

10. Способ экспрессии полипептида в трихомах растений, включающий:

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

- (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29; и
- (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29, и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения;

причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид; и

(b) выращивание указанного растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию указанного полипептида.

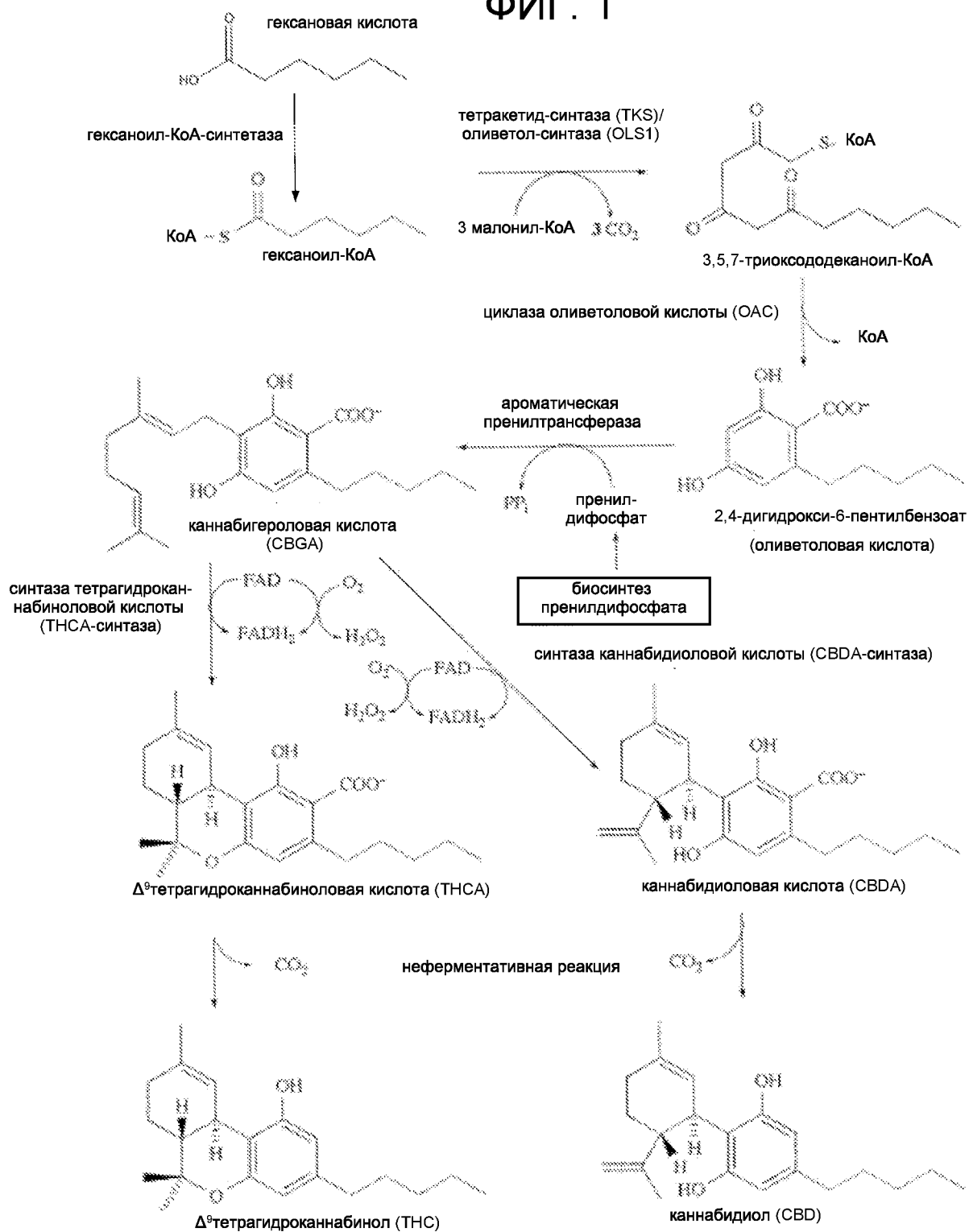
11. Способ увеличения уровня каннабиноида в трихоме растения-хозяина, включающий:
- (a) введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:
    - (i) нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29; и
    - (ii) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29, и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения;причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты согласно (i) или (ii) функционально связана с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент пути биосинтеза каннабиноидов; и
  - (b) выращивание указанного растения в условиях, позволяющих проводить экспрессию указанного фермента пути биосинтеза каннабиноидов;
- причем экспрессия указанного фермента пути биосинтеза каннабиноидов приводит к получению растения, которое характеризуется повышенным содержанием каннабиноида по сравнению с контрольным растением, выращенным в подобных условиях.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный фермент пути биосинтеза каннабиноидов представляет собой синтазу каннабидиоловой кислоты (CBDA), синтазу каннабихроменовой кислоты (CBCA) или синтазу  $\Delta^9$ тетрагидроканнабиноловой кислоты (THCA).
13. Способ по п. 12, дополнительно включающий обеспечение растения каннабигероловой кислотой (CBGA).
14. Генетически сконструированное растение, полученное способом по п. 11, отличающееся тем, что указанное растение характеризуется повышенным содержанием  $\Delta^9$ тетрагидроканнабинола (THC), каннабихромена (CBC) и/или каннабидиола (CBD) по сравнению с контрольным растением.

15. Генетически сконструированная клетка растения, содержащая химерный ген, встроенный в геном, причем указанный химерный ген содержит трихома-специфичный промотор, функционально связанный с гомологичной или гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, и причем указанный промотор выбран из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29; и
- (b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16-19, 21-26, 28 или 29, и которая кодирует промотор, обладающий транскрипционной активностью, специфичной к железе трихомы растения.

16. Генетически сконструированная клетка растения по п. 15, отличающаяся тем, что указанная клетка растения представляет собой клетку растения *N. tabacum* или клетку растения *C. sativa*.

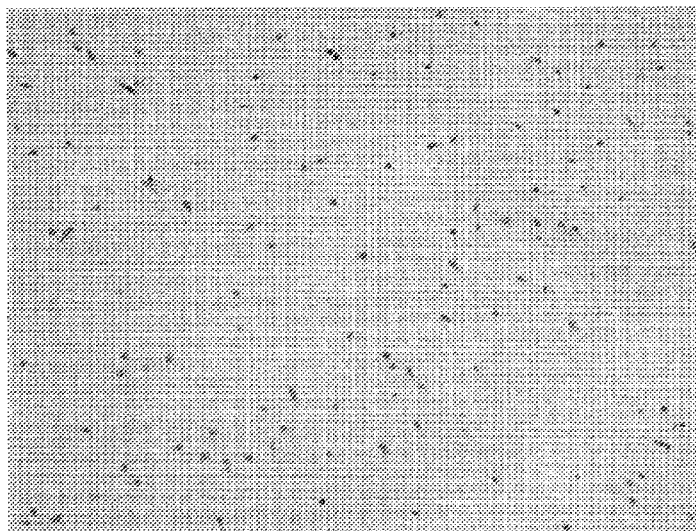
ФИГ. 1



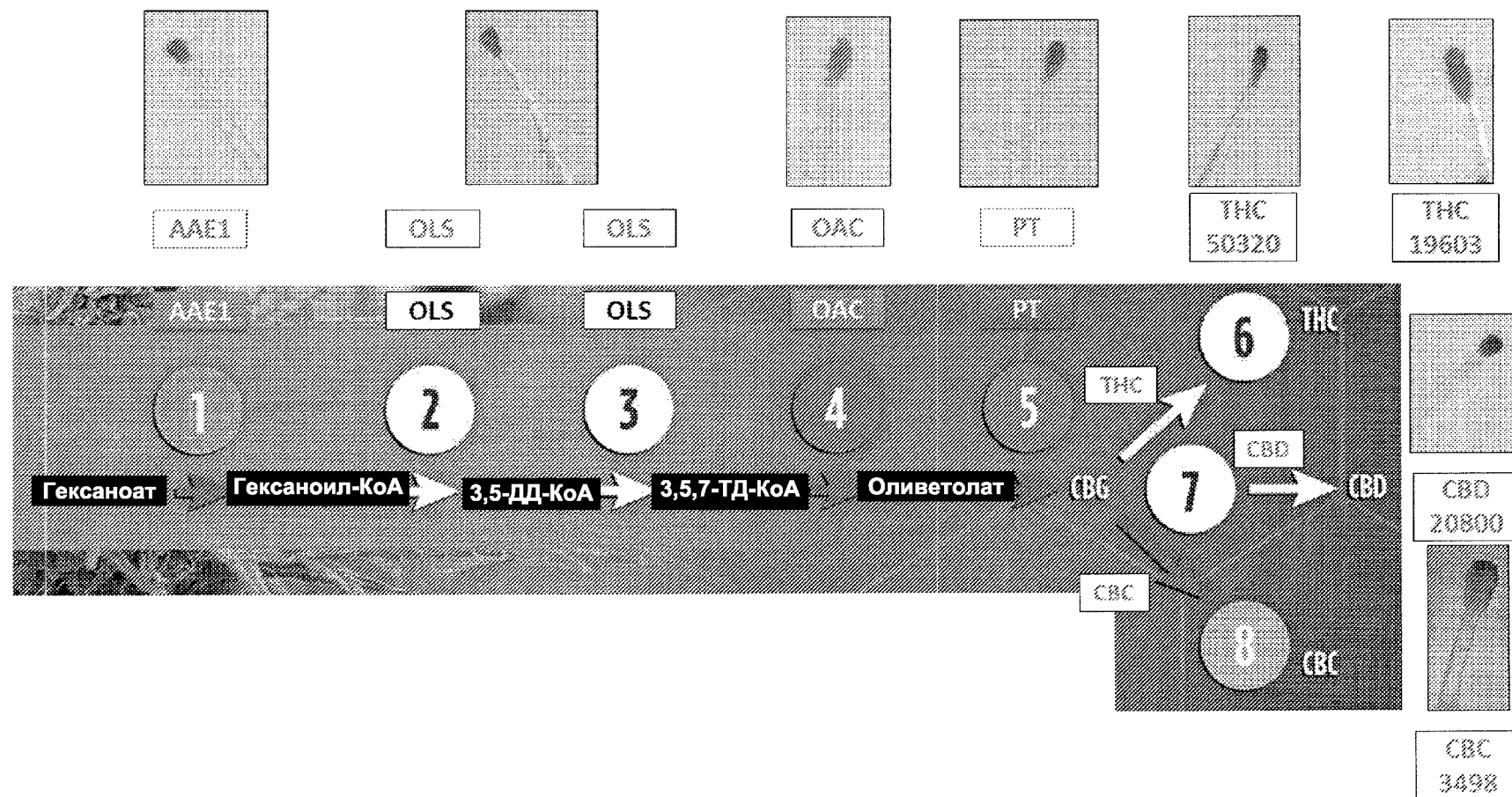
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



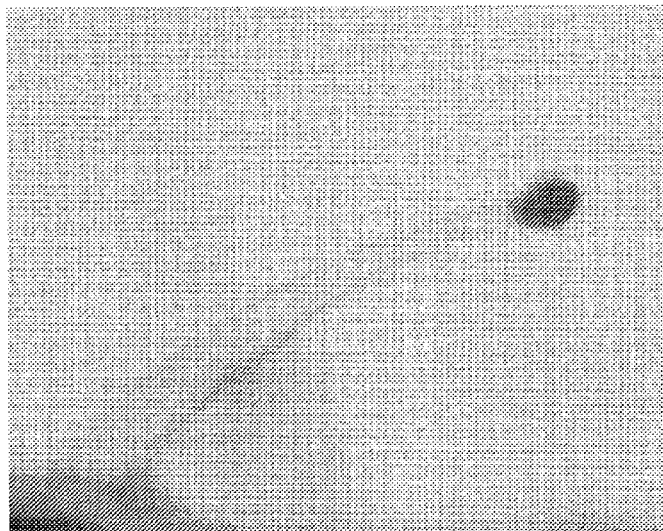
ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202292309**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C12N 15/82, 15/52, C07K 14/415, A01H 5/10, 6/28

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей                                                                   | Относится к пункту № |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Y          | US 2015/0315602 A1 (KEYGENE N.V.) 05.11.2015, реферат, параграфы [0015], [0025], [0032], [0042], [0071], [0081], [0091]-[0092], формула | 1-16                 |
| Y          | US 2016/0177404 A1 (COURTAGEN LIFE SCIENCE INC.) 23.06.2016, формула                                                                    | 1-16                 |
| A          | US 2014/0298511 A1 (BIOTECH INSTITUTE, LLC) 02.10.2014, реферат                                                                         | 1-16                 |
| A          | WO 2016/030828 A1 (FULL SPECTRUM LABORATORIES LIMITED) 03.03.2016, реферат                                                              | 1-16                 |
| A          | US 2010/0218283 A1 (RO DAE-KYUN et al.) 26.08.2010, реферат                                                                             | 1-16                 |
| A          | US 6730826 B2 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION) 04.05.2004, реферат                                                          | 1-16                 |

☐ последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

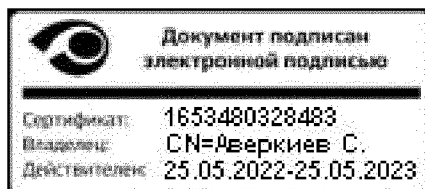
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 23 января 2023 (23.01.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202292309**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 15/82 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)  
C07K 14/415 (2006.01)  
A01H 5/10 (2018.01)  
A01H 6/28 (2018.01)