(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293005 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.23

(22) Дата подачи заявки
2021.04.20

(51) Int. Cl. ***C07K 14/435*** (2006.01)
A01N 63/50 (2020.01)
A01N 65/00 (2009.01)

(54) ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ СТАБИЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДА U1-АГАТОКСИН-Ta1b ДЛЯ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ

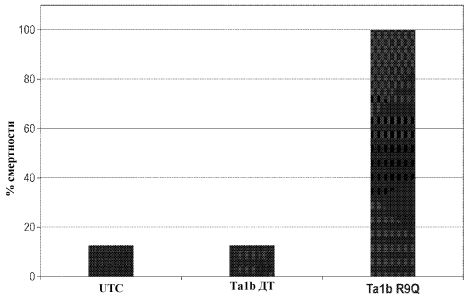
(31) **63/012,755**
(32) **2020.04.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/028254**
(87) **WO 2021/216621 2021.10.28**
(88) **2021.12.16**

(71) Заявитель:
ВЕСТЭРОН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Шнайдер Кайл, Хазе Александра, Дэвис Брек, Гарретт Райан (US)

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

(57) Новые инсектицидные белки, нуклеотиды, пептиды и их экспрессия в растениях. Методы получения новых нуклеотидов и новых пептидов, новые процессы, новые технологии производства, новые составы и новые организмы. В настоящем изобретении также предложены и описаны новые пептиды, называемые TVP, которые представляют собой неприродные вариации пептидов, основанные на токсине U1-агатоксин-Ta1b, полученном из паука Hobo. В данном документе описаны гены, кодирующие TVP; составы и комбинации, содержащие гены TVP и/или пептиды; и использующие их способы, применимые для борьбы с вредителями.



202293005 A1

202293005 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576108EA/023

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ СТАБИЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДА U1-АГАТОКСИН-TA1B ДЛЯ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/012755, поданной 20 апреля 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Данная заявка полностью включает посредством ссылки Перечень последовательностей под названием «225312-490536_ST25.txt» (68 КБ), который был создан 20 апреля 2021 г. в 18:39 и подан в электронном виде.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Описаны и заявлены средства новые инсектицидные белки, нуклеотиды, пептиды, их экспрессия в растениях, способы получения пептидов, новые процессы, технологии производства, новые пептиды, новые составы и комбинации новых и известных организмов, дающие более высокий выход, чем можно было бы ожидать от родственных пептидов для борьбы с насекомыми.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Многие насекомые являются переносчиками болезней. Комары рода Anopheles являются основными переносчиками вируса Зика, вируса Чикунгунья и малярии, заболевания, вызываемого простейшими рода Trypanosoma. Aedes aegypti является основным переносчиком вирусов, вызывающих желтую лихорадку и Денге. Другие вирусы, возбудители различных видов энцефалита, также переносятся комарами Aedes spp. Wuchereria bancrofti и Brugia malayi, паразитические круглые черви, вызывающие филяриатоз, обычно переносятся комарами родов Culex, Mansonia и Anopheles.

Слепни и слепни-златоглазики могут передавать бактериальные возбудители туляремии (Pasteurella tularensis) и сибирской язвы (Bacillus anthracis), а также паразитическую аскариду (Loa loa), вызывающую лоаоз в тропической Африке.

Глазной гнус рода Hippelates может переносить возбудитель спирохет, вызывающий фрамбезию (Treponema pertenue), а также распространять конъюнктивит (pinkeye). Мухи цеце из рода Glossina являются переносчиками простейших патогенов, вызывающих африканскую сонную болезнь (Trypanosoma gambiense и T. rhodesiense). Москиты рода Phlebotomus являются переносчиками бактерии (Bartonella bacilliformis), вызывающей болезнь Карриона (лихорадку оройо) в Южной Америке. В некоторых частях Азии и Северной Африки они распространяют вирусный агент, вызывающий лихорадку москитов (лихорадку Паппатачи), а также простейшие патогены (Leishmania spp.), вызывающие лейшманиоз.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены вариант полипептида U1-агатоксин-Ta1b

(TVP), композиции, содержащие TVP, инсектицидные белки, содержащие один или несколько TVP, необязательно с другими белками, и способы их применения для искоренения, уничтожения, борьбы, ингибирования, повреждения, нарушения поведения, стерилизации или их комбинации, одного или нескольких видов насекомых. Описанные в данном документе TVP обладают инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких видов насекомых. TVP по настоящему изобретению имеют аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R- X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-X_6, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; и при этом X_6 представляет собой G или отсутствует. Было показано, что TVP, описанные в настоящем документе, нокаутируют 50% популяции с концентрацией (KD_{50}) ниже 200 пмоль/г в отношении комнатных мух через 24 часа и вызывают 100% смертность трипсов на 4-й день.

В настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описана композиция, состоящая из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V,

M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

Кроме того, в настоящем изобретении описана композиция, состоящая из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

Кроме того, в настоящем изобретении описан полинуклеотид, кодирующий TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом TVP содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарная ему нуклеотидная последовательность.

Кроме того, в настоящем изобретении описан способ получения TVP, включающий: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему

нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP и секрецию в питательную среду.

Кроме того, в настоящем изобретении описан способ применения композиций, описанных выше, для борьбы с насекомыми, включающий доставку композиций к очагу насекомого.

Кроме того, в настоящем изобретении описан способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид.

Кроме того, в настоящем изобретении описан способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества описанных выше композиций к очагу вредителя или к растению или животному, подверженному нападению вредителя.

Кроме того, в настоящем изобретении описан вектор, содержащий полинуклеотид, способный кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность с 90% сходством с последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

Кроме того, в настоящем изобретении описан штамм дрожжей, содержащий: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описана композиция, состоящая из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

Кроме того, в настоящем изобретении описана композиция, состоящая из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в настоящем изобретении описан инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 представлена карта векторов интеграции Ta1b, содержащая круговой вектор из 9210 пар нуклеотидов, который содержит следующие последовательности: бактериальный Ori/AmpR; 3'-промотор Lac4; сигнальная последовательность α-MF (обозначенная на фигуре как «a-MF»); полинуклеотид, кодирующий вариант полипептида U1-агатоксин-Ta1b (обозначенный на фигуре как «Ta1b»); терминатор Lac4; маркер amdS (указанный как «маркер Amd») и 5'-промотор Lac4.

На **ФИГ. 2** показаны результаты анализа инъекций комнатной мухе, в которых активность Ta1b дикого типа и TVP с аминокислотными заменами в положениях R9Q и R9N вводили внутригрудно мухам, а затем определяли дозу TVP, необходимую для 50% нокдауна (KD_{50}) через 24 часа после инъекции.

На ФИГ. 3 показаны результаты анализа выживания трипсов, оценивающего процент смертности (% смертности) необработанного контроля (UTC), U1-агатоксин-Ta1b дикого типа (Ta1bWT) и TVP с аминокислотной заменой в положении R9Q.

На ФИГ. 4 показана хроматограмма ВЭЖХ TVP с аминокислотной заменой в положении R9Q (TVP-R9Q), показывающая предполагаемые виды гликозилирования в

виде «плеча» с левой стороны основного пика TVP (показано черной стрелкой).

На ФИГ. 5 показаны результаты ESI-MS, показывающие масс-спектры TVP-R9Q. На вставке изображена деконволюция многозарядных частиц и рассчитаны массы 5732 и 5894 Да. Ожидаемая молекулярная масса полностью окисленного TVP-R9Q составляет 5731,3.

На ФИГ. 6 показаны результаты хроматограммы ВЭЖХ TVP-R9Q. Гликозилирование показано меньшим «плечом» с левой стороны основного пика.

На ФИГ. 7 показаны результаты хроматограммы ВЭЖХ TVP-R9QΔG. Гликозилирование показано меньшим «плечом» с левой стороны основного пика. Частичный протеолиз показан на правом плече.

На ФИГ. 8 показаны результаты хроматограммы ВЭЖХ TVP- R9Q/T43A/ΔG. Событие протеолиза демонстрируется наличием двух плеч: меньшее «плечо» с левой стороны основного пика указывает на событие частичного протеолиза.

На ФИГ. 9 показаны результаты хроматограммы ВЭЖХ TVP-R9Q/T43A. Здесь присутствует один вид TVP.

На ФИГ. 10 показаны результаты хроматограммы ВЭЖХ TVP-R9Q/T43A/ΔK-G. Здесь присутствует один вид TVP.

На ФИГ. 11 показаны результаты ESI-MS, показывающие масс-спектры TVP-R9Q/T43A/ΔG.

На ФИГ. 12 показаны результаты ESI-MS, показывающие масс-спектры TVP-R9Q/T43A.

На ФИГ. 13 показаны результаты ESI-MS, показывающие масс-спектры TVP-R9Q/T43A/ΔK-G.

На ФИГ. 14 показаны результаты ESI-MS, показывающие масс-спектры TVP-R9Q/T43A/ΔK-G.

На ФИГ. 15 показаны результаты анализа инъекции комнатной мухе с использованием TVP после удаления сайта гликозилирования и/или С-концевых аминокислот.

На ФИГ. 16 показаны результаты анализа стабильности состава жидкого концентрата (ЖК), оцененные при различных температурах с течением времени. Состав ЖК включал 2% TVP-R9Q/T43A; 0,03% бензизотиазолинона (БИТ); 2% сорбита; а оставшееся количество состава ЖК представляло собой ферментированное пиво, т.е. концентрат клеток, отделенных от ферментированного пива, оценивали с помощью ВЭЖХ для определения стабильности TVP-R9Q/T43A при различных температурах и с течением времени. Оцениваемые температуры составляли 4°C, 21°C, 37°C, 45°C и 54°C. Оцениваемое время составляло 0, 16, 31, 42, 98 и 114 дней.

На ФИГ. 17 показаны результаты анализа стабильности TVP-R9Q/T43A в форме порошка, высушенного распылением (SDP). В данном случае состав SDP был создан из высушенного ферментированного пива. Стабильность TVP-R9Q/T43A в SDP оценивали с помощью ВЭЖХ для количественного определения количества TVP-R9Q/T43A в мг/мл

при 21°C, 37°C и 45°C с пакетом поглотителя кислорода/влаги и без него. Результаты, заключенные в черный квадрат, показывают результаты, полученные при использовании пакета поглотителя кислорода/влаги.

На ФИГ. 18 показаны результаты анализа деградации, выполненного для оценки предварительной стабильности составов. Составы тестировали при 54°C, 37°C и 21°C в течение 2 недель. Каждая группа номеров составов (т. е. 7; 18; 21; 2-1; 2-2 и 2-3) обозначается номером состава, за которым следует косая черта «/», а затем температура испытания, т. е. 54°C, 37°C и 21°C.

На ФИГ. 19 показаны результаты анализа стабильности составов, содержащих бензизотиазолинон (БИТ), для определения их совместимости с TVP. В данном случае состав отделяли от клеток, и концентрированное ферментированное пиво получали из клеток, экспрессирующих TVP-R9Q/T43A. Образцы оценивали при T0 (время сразу после приготовления и сушки распылительной сушилкой при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе. Каждый состав тестировали при 4°C, 21°C, 37°C и 45°C.

На ФИГ. 20 показаны результаты анализа стабильности составов, содержащих бензизотиазолинон (БИТ), для определения их совместимости с TVP. В данном случае состав представляет собой порошок, высушенный распылением (SDP), содержащий TVP-R9Q/T43A. Образцы оценивали при T0 (время сразу после приготовления и сушки распылительной сушилкой при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе. Каждый состав тестировали при 4°C, 21°C, 37°C и 45°C.

На ФИГ. 21 показаны результаты анализа стабильности pH. В данном случае скрининг стабильности pH проводили для определения влияния pH на стабильность TVP-R9Q/T43A; 1 часть на тысячу (ppt) TVP-R9Q/T43A инкубировали при различных значениях pH. TVP-R9Q/T43A инкубировали при 45°C в течение 7 дней и анализировали с помощью ВЭЖХ для определения процента оставшегося пептида. Как показано в данном документе, оптимальное значение pH было установлено в диапазоне от 6,5 до 7,5.

На **ФИГ. 22** показаны результаты панели стабильности, часть I, которая включает составы №№ 1-17. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); мальтодекстрин; трегалоза; мальтоза; K_2HPO_4; KH_2PO_4 и БИТ (9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она). Образцы оценивали при T0 (время сразу после приготовления и сушки распылительной сушилкой при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ.

На ФИГ. 23 показаны результаты панели стабильности, часть II, которая включает составы №№ 18-28. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в

форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); мальтодекстрин; трегалоза; мальтоза; K_2HPO_4; KH_2PO_4; БИТ (9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она) и лигносульфонат. Образцы оценивали при T0 и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе.

На ФИГ. 24 показано фото, демонстрирующее ломкие твердые агломераты, которые образовались при хранении при 54°C через 2 недели.

На **ФИГ. 25** показано фото, демонстрирующее физическую форму, полученную после добавления лигносульфоната. Как показано в данном документе, хотя добавление лигносульфоната и предотвращало образование ломкого твердого вещества, оно, тем не менее, не предотвращало комкование после инкубации при 54°C в течение 2 недель.

На ФИГ. 26 показаны результаты панели стабильности, часть III, которая включает составы №№ 18-28. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); трегалоза; лигносульфат; мальтодекстрин; K_2HPO_4; KH_2PO_4 и БИТ (9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она). В данном случае гистограмма показывает теоретическую концентрацию пептида на основе состава композиции, описанного в таблице выше (черный столбец). Фактическое процентное содержание пептида при T0 показано серым столбцом. Фактическое процентное содержание пептида после двухнедельной инкубации при 54°C в течение 2 недель показано заштрихованным столбцом.

На ФИГ. 27 показано фото, демонстрирующее физическую форму Состава № 35 (в лотке, стоящем на пакете с надписью «Form 7»). Как показано в данном документе, Состав № 35 был способен сохранять форму сухого сыпучего порошка после инкубации при 54°C в течение 2 недель.

На ФИГ. 28 показано фото, демонстрирующее физическую форму Состава № 36 (в лотке, стоящем на пакете с надписью «Form 8»). Как показано в данном документе, Состав № 36 был способен сохранять форму сухого сыпучего порошка после инкубации при 54°C в течение 2 недель.

На ФИГ. 29представлено краткое описание теоретических составов (средние значения) четырех сухих гранулированных составов-прототипов.

На ФИГ. 30 представлены результаты анализа стабильности испытаний четырех прототипов, испытания №№ 1-4. Четыре прототипа были оценены на устойчивость к высоким температурам посредством инкубации при 54°C в течение двух недель в присутствии пакета поглотителя кислорода/влаги. Измерение пептида TVP-R9Q/T43A проводили с использованием ВЭЖХ-УФ при T0 (после приготовления состава и сушки) и T2W (время через 2 недели).

На ФИГ. 31 показано фото, демонстрирующее физическую форму, полученную в результате испытания № 1, после инкубации при 54°C в течение 2 недель. В данном случае физическая форма представляет собой сухую сыпучую гранулированную форму.

На ФИГ. 32 показано фото, демонстрирующее физическую форму, полученную в результате испытания № 2, после инкубации при 54°C в течение 2 недель. В данном случае физическая форма представляет собой сухую сыпучую гранулированную форму.

На ФИГ. 33 показано фото, демонстрирующее физическую форму, полученную в результате испытания № 3, после инкубации при 54°C в течение 2 недель. В данном случае физическая форма представляет собой сухую сыпучую гранулированную форму.

На ФИГ. 34 показано фото, демонстрирующее физическую форму, полученную в результате испытания № 1, после инкубации при 54°C в течение 2 недель. В данном случае физическая форма представляет собой сухую сыпучую гранулированную форму.

На **ФИГ. 35** показаны результаты анализа кругового дихроизма (КД). Добавление 10% трегалозы стабилизирует третичную структуру TVP-R9Q/T43A, на что указывают углубляющиеся спектры КД при 214 нм и 220 нм, которые показывают, что пептид стал более альфа-спиральным, что соответствует его трехмерной структуре.

На ФИГ. 36 показаны результаты анализа кругового дихроизма (КД), оценивающего характеристики плавления. В данном случае, добавление 10% трегалозы повышает температуру плавления TVP-R9Q/T43A с 71,6°C до 73,6°C, поддерживая его повышенную стабильность в присутствии трегалозы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

«5’-конец» и «3’-конец» относятся к направленности, т.е. к направлению нуклеотидного полимера от одного конца к другому (например, ДНК). 5’-конец полинуклеотида - это конец полинуклеотида, который имеет пятый углерод.

«5'- и 3'-гомологические плечи» или «5'- и 3'-плечи» или «левое и правое плечи» относятся к полинуклеотидным последовательностям в векторе и/или нацеливающем векторе, которые гомологично рекомбинируют с последовательностью генома-мишени и/или представляющего интерес эндогенного гена в организме-хозяине для достижения успешной генетической модификации хромосомного локуса организма-хозяина.

«Промотор ADN1» относится к сегменту ДНК, состоящему из последовательности промотора, полученной из гена белка 1 Schizosaccharomyces pombe с дефектом адгезии.

«Аффект» относится к тому, как что-то одно влияет на другое, например, как пептид, полипептид, белок, лекарственный препарат или химическое вещество влияют на насекомое, например, на вредителя.

«Агент» относится к одному или нескольким химическим веществам, молекулам, нуклеотидам, полинуклеотидам, пептидам, полипептидам, белкам, токсинам, отравляющим веществам, ядам, инсектицидам, пестицидам, органическим соединениям, неорганическим соединениям, прокариотическим организмам или эукариотическим организмам (и агентам, полученным из указанных прокариотических или эукариотических организмов).

«Сельскохозяйственно приемлемый носитель» охватывает все адъюванты, инертные компоненты, диспергаторы, поверхностно-активные вещества, липкие вещества,

связующие вещества и т. д., которые обычно используются в технологии приготовления пестицидов; они хорошо известны специалистам в области пестицидов.

«Сельскохозяйственно приемлемая соль» используется в данном документе как синоним термина «фармацевтически приемлемая соль».

«Агроинфекция» означает способ трансформации растений, при котором ДНК вводят в клетку растения с использованием Agrobacteria tumefaciens или Agrobacteria rhizogenes.

«Выравнивание» относится к методу сравнения двух или более последовательностей (например, последовательностей нуклеотидов, полинуклеотидов, аминокислот, пептидов, полипептидов или белков) с целью определения их взаимосвязи друг с другом. Выравнивание обычно выполняют с помощью компьютерных программ, применяющих различные алгоритмы, однако также возможно выполнить выравнивание вручную. Программы выравнивания обычно повторяют потенциальное выравнивание последовательностей и оценивают выравнивания с использованием таблиц замещения, используя различные стратегии для достижения потенциального оптимального показателя выравнивания. Обычно используемые алгоритмы выравнивания включают, помимо прочего, CLUSTALW (*см.* Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680, 1994); CLUSTALV (*см.* Larkin M. A., et al., CLUSTALW2, ClustalW and ClustalX version 2, Bioinformatics 23(21): 2947-2948, 2007); Mafft; Kalign; ProbCons и T-Coffee (*см.* Notredame et al., T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments, Journal of Molecular Biology 302: 205-217, 2000). Примеры программ, которые реализуют один или несколько вышеперечисленных алгоритмов, включают, помимо прочего, MegAlign от DNAStar (DNAStar, Inc. 3801 Regent St. Madison, Wis. 53705), MUSCLE, T-Coffee, CLUSTALX, CLUSTALV, JalView, Phylip и Discovery Studio от Accelrys (Accelrys, Inc., 10188 Telesis Ct, Suite 100, San Diego, Calif. 92121). В некоторых вариантах осуществления выравнивание вводит «фазовые сдвиги» и/или «пробелы» в одну или обе сравниваемые последовательности, чтобы максимально увеличить сходство между двумя последовательностями, а оценка относится к процессу количественного выражения сходства выровненных последовательностей.

«Сигнал альфа-MF» или «сигнал секреции αMF» относится к белку, который направляет зарождающиеся рекомбинантные полипептиды на секреторный путь.

«Паукообразные» относятся к классу членистоногих. Например, в некоторых вариантах осуществления паукообразные могут означать пауков, скорпионов, клещей, сенокосцев или солифуг.

«BAAS» означает сигнальный пептид альфа-амилазы ячменя и является примером СПЭР. Одним из примеров BAAS является BAAS, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 (номер доступа NCBI № AAA32925.1).

«Биомасса» относится к любому измеренному растительному продукту.

«Бинарный вектор» или «бинарный вектор экспрессии» означает вектор экспрессии, который может реплицироваться как в штаммах E.coli, так и в штаммах Agrobacterium. Кроме того, вектор содержит область ДНК (часто называемую т-ДНК), заключенную в скобки левой и правой пограничными последовательностями, которая распознается генами вирулентности для копирования и доставки в растительную клетку Agrobacterium.

«п.н.» или «пара нуклеодитов» относится к молекуле, содержащей два химических основания, связанных друг с другом. Например, молекула ДНК состоит из двух переплетающихся цепей, каждая из которых имеет остов, состоящий из чередующихся дезоксирибозных и фосфатных групп. К каждой дезоксирибозе присоединено одно из четырех нуклеотидов, то есть аденин (A), цитозин (C), гуанин (G) или тимин (T), где аденин образует пару нуклеодитов с тимином, а цитозин образует пару нуклеодитов с гуанином.

«С-концевой» относится к свободной карбоксильной группе (т.е. -COOH), которая расположена на конце полипептида.

Термины «кДНК», или «копия ДНК», или «комплементарная ДНК» относятся к молекуле, которая комплементарна молекуле РНК. В некоторых вариантах осуществления кДНК может быть либо одноцепочечной, либо двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления кДНК может представлять собой двухцепочечную ДНК, синтезированную из матрицы одноцепочечной РНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой.В других вариантах осуществления «кДНК» относится ко всем нуклеиновым кислотам, которые имеют общее расположение элементов последовательности, обнаруженное в нативных зрелых видах мРНК, где элементами последовательности являются экзоны и 3’- и 5’-некодирующие области. Обычно виды мРНК имеют смежные экзоны, а промежуточные интроны удаляются сплайсингом ядерной РНК, чтобы создать непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую белок. В некоторых вариантах осуществления «кДНК» относится к ДНК, которая комплементарна матрице мРНК и получена из нее.

«CEW» относится к кукурузному червю.

«Отщепляемый линкер» см. Линкер.

«Клонирование» относится к процессу и/или методам, касающимся вставки сегмента ДНК (например, обычно представляющего интерес гена, например, tvp) из одного источника и его рекомбинации с сегментом ДНК из другого источника (например, обычно вектора, например, плазмиды), а также направления рекомбинированной ДНК или «рекомбинантной ДНК» к репликации, обычно путем трансформации рекомбинированной ДНК в бактерии или дрожжи-хозяева.

«Кодирующая последовательность» или «CDS» относится к последовательности полинуклеотида или нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована (например, в случае ДНК) или транслирована (например, в случае мРНК) в пептид, полипептид или белок, при помещении под контроль соответствующих регуляторных

последовательностей и в присутствии необходимых транскрипционных и/или трансляционных молекулярных факторов. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном трансляции на 5'-(амино)конце и стоп-кодоном трансляции на 3'-(карбокси)конце. Последовательность терминации транскрипции обычно располагается 3’ от кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность может быть фланкирована на 5’- и/или 3’-концах нетранслируемыми областями. В некоторых вариантах осуществления кодирующую последовательность можно использовать для получения пептида, полипептида или белкового продукта. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность может быть или не быть слита с другой кодирующей последовательностью или сигналом локализации, таким как сигнал ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность может быть клонирована в вектор или конструкцию экспрессии, может быть интегрирована в геном или может присутствовать в виде фрагмента ДНК.

«Оптимизация кодонов» относится к получению гена, в котором один или несколько эндогенных, нативных кодонов и/или кодонов дикого типа заменены кодонами, которые в конечном итоге по-прежнему кодируют ту же аминокислоту, но являются предпочтительными для соответствующего хозяина.

«Комплементарный» относится к топологической совместимости или совпадению взаимодействующих поверхностей двух полинуклеотидов, как это понимают специалисты в данной области техники. Таким образом, две последовательности являются «комплементарными» друг другу, если они способны гибридизоваться друг с другом с образованием стабильной антипараллельной двухцепочечной структуры нуклеиновой кислоты. Первый полинуклеотид является комплементарным второму полинуклеотиду, если нуклеотидная последовательность первого полинуклеотида по сути идентична нуклеотидной последовательности партнера по связыванию полинуклеотида второго полинуклеотида, или если первый полинуклеотид может гибридизоваться со вторым полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации. Таким образом, полинуклеотид, последовательность которого представляет собой 5'-TATAC-3', является комплементарным полинуклеотиду, последовательность которого представляет собой 5'-GTATA-3'.

«Кондиционированная среда» означает среду для культивирования клеток, которая была использована клетками и обогащена материалами, полученными из клеток, но не содержит клеток.

«Количество копий» относится к количеству идентичных копий вектора, кассеты экспрессии, единицы амплификации, гена или любой определенной нуклеотидной последовательности, которые присутствуют в клетке-хозяине в любой момент времени. Например, в некоторых вариантах осуществления ген или другая определенная хромосомная последовательность нуклеотидов может присутствовать в одной, двух или более копиях на хромосоме. Автономно реплицирующийся вектор может присутствовать

в одной или нескольких сотнях копий на клетку-хозяина.

«Культура» или «культура клеток» относится к поддержанию клеток в искусственной среде in vitro.

«Культивирование» относится к размножению организмов на различных типах сред или в них. Например, термин «культивирование» может означать выращивание популяции клеток в подходящих условиях в жидкой или твердой среде.В некоторых вариантах осуществления культивирование относится к ферментативной рекомбинантной продукции представляющего интерес гетерологичного полипептида и/или других желаемых конечных продуктов (обычно в сосуде или реакторе).

«Цистин» относится к окисленному димеру цистеина. Цистины представляют собой серосодержащие аминокислоты, полученные путем окисления двух молекул цистеина и связанные дисульфидной связью.

«Определенная среда» означает среду, состоящую из известных химических компонентов, но не содержащую неочищенные белковые экстракты или побочные продукты, такие как дрожжевой экстракт или пептон.

«Дисульфидная связь» означает ковалентную связь между двумя цистеиновыми аминокислотами, полученную путем связывания двух тиоловых групп на их боковых цепях.

«Вырожденность» или «вырожденность кодонов» относится к явлению, когда одна аминокислота может кодироваться разными нуклеотидными кодонами. Таким образом, нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или полипептид, может изменяться из-за вырожденности. В результате вырожденности генетического кода многие последовательности нуклеиновых кислот могут кодировать данный полипептид с определенной активностью; такие функционально эквивалентные варианты рассматриваются в данном документе.

«ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте, состоящей из полимера одного или нескольких дезоксирибонуклеотидов или нуклеотидов (т. е. аденина [A], гуанина [G], тимина [T] или цитозина [C]), которые могут быть расположены в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Например, один или несколько нуклеотидов создают полинуклеотид.

«дНТФ» относится к нуклеозидтрифосфатам, которые составляют ДНК и РНК.

«Двойная кассета экспрессии» относится к двум кассетам экспрессии TVP, содержащимся в одном и том же векторе.

«Двойной трансгенный вектор экспрессии пептида» или «двойной трансгенный вектор экспрессии» означает вектор экспрессии дрожжей, который содержит две копии кассеты экспрессии TVP.

«Эндогенный» относится к полинуклеотиду, пептиду, полипептиду, белку или процессу, который естественным образом возникает и/или существует в организме, например, молекуле или активности, которая уже присутствует в клетке-хозяине до конкретной генетической манипуляции.

«Энхансерный элемент» относится к последовательности ДНК, функционально связанной с промотором, которая может проявлять повышенную транскрипционную активность в отношении промотора по сравнению с транскрипционной активностью, которая является результатом действия промотора в отсутствие энхансерного элемента.

«ЭР» или «Эндоплазматический ретикулум» представляет собой субклеточную органеллу, общую для всех эукариот, в которой происходят некоторые процессы посттрансляционной модификации.

«СПЭР» или «сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума» представляет собой N-концевую аминокислотную последовательность, которая во время трансляции белка молекулы мРНК, кодирующей TVP, распознается и связывается частицей распознавания сигнала клетки-хозяина, которая перемещает комплекс рибосома/мРНК для трансляции белка в ЭР в цитоплазме. В результате трансляция белка приостанавливается до тех пор, пока он не стыкуется с ЭР, где она продолжается, и полученный белок вводится в ЭР.

“ersp” относится к полинуклеотиду, кодирующему пептид СПЭР.

«Доставка в ЭР» означает транспортировку экспрессированного в клетке белка в ЭР для посттрансляционной модификации, сортировки и транспортировки.

«Эксципиент» относится к любому фармакологически неактивному, природному или синтетическому компоненту или веществу, которое вводят в состав вместе (например, одновременно) или после активного ингредиента по настоящему изобретению (т.е. TVP или TVP-инсектицидного белка). В некоторых вариантах осуществления эксципиент может представлять собой любую добавку, адъювант, связующее вещество, объемообразующий агент, носитель, покрытие, разбавитель, дезинтегрант, наполнитель, глидант, смазывающее вещество, консервант, носитель или их комбинацию, с которыми можно вводить TVP или TVP-инсектицидный белок по настоящему изобретению, и/или которые применимы при приготовлении композиции по настоящему изобретению. Эксципиенты включают любые такие материалы, известные в данной области техники, которые нетоксичны и не взаимодействуют с другими компонентами композиции. В некоторых вариантах осуществления эксципиенты могут быть включены в состав вместе с TVP или TVP-инсектицидным белком при приготовлении композиции с целью наполнения композиций (поэтому их часто называют объемообразующими агентами, наполнителями или разбавителями). В других вариантах осуществления эксципиент может быть использован для улучшения действия активного ингредиента в конечной лекарственной форме, такого как облегчение всасывания и/или растворимости. В еще других вариантах осуществления можно использовать вспомогательное вещество для обеспечения стабильности или предотвращения загрязнения (например, микробного загрязнения). В других вариантах осуществления можно использовать эксципиент для придания физического свойства композиции (например, композиции, которая представляет собой сухую гранулированную или сухую сыпучую порошкообразную физическую форму). Ссылка на эксципиент включает как один, так и более одного такого

эксципиента. Подходящие фармацевтические эксципиенты описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

«Кассета экспрессии» относится к (1) представляющей интерес последовательности ДНК, например, полинуклеотиду, способному кодировать TVP; и одному или более из следующего: (2) промоторы, терминаторы и/или энхансерные элементы; (3) соответствующий мРНК-стабилизирующий сигнал полиаденилирования; (4) внутренний сайт посадки рибосомы (IRES, англ.: internal ribosome entry site); (5) интроны; и/или (6) посттранскрипционные регуляторные элементы. Комбинация (1) по меньшей мере с одним из (2)-(6) называется «кассетой экспрессии». В некоторых вариантах осуществления в вектор может быть клонировано множество кассет экспрессии. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть первая кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид, способный кодировать TVP. В альтернативных вариантах осуществления имеются две кассеты экспрессии, каждая из которых содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP (т.е. двойная кассета экспрессии). В других вариантах осуществления имеются три кассеты экспрессии, способные кодировать TVP (т.е. тройная кассета экспрессии). В некоторых вариантах осуществления двойная кассета экспрессии может быть получена путем субклонирования второй кассеты экспрессии в вектор, содержащий первую кассету экспрессии. В некоторых вариантах осуществления тройная кассета экспрессии может быть получена путем субклонирования третьей кассеты экспрессии в вектор, содержащий первую и вторую кассеты экспрессии. Способы, касающиеся кассет экспрессии и способов клонирования, хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. *См. также* кассету экспрессии TVP.

«Экспрессионная ОРС» означает нуклеотид, кодирующий комплекс белка, и определяется как нуклеотиды в ОРС.

«FECT» означает временную систему экспрессии растений с использованием вируса мозаики лисохвоста с элиминацией гена белка оболочки и тройного блока генов.

«Ферментированное пиво» относится к отработанной среде для ферментации, т.е. супернатанту среды для ферментации после удаления организмов, который был инокулирован и поглощен трансформированной клеткой-хозяином (например, дрожжевой клеткой, способной экспрессировать TVP по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления термин «ферментированное пиво» относится к раствору, полученному после ферментации трансформированной клетки-хозяина. Термин «ферментация» в широком смысле относится к ферментативному и анаэробному или аэробному расщеплению органических веществ (например, углеродного субстрата), питательных веществ микроорганизмами в контролируемых условиях (например, при температуре, содержании кислорода, pH, питательных веществах и т.п.) для получения продуктов ферментации (например, одного или нескольких пептидов по настоящему изобретению). Хотя термин «ферментация» обычно описывает процессы, протекающие в анаэробных условиях, используемый в данном документе термин не подразумевает, что

этот термин ограничивается исключительно строгими анаэробными условиями, поскольку используемый в данном документе термин «ферментация» может также происходить в процессах, протекающих в присутствии кислорода.

«Твердые вещества ферментации» относятся к твердым веществам (в том числе растворенным), которые остаются от ферментированного пива во время процесса ферментации на основе дрожжей и состоят в основном из солей, источника сложного белка, витаминов и дополнительных побочных продуктов дрожжей с граничным значением молекулярной массы от около 200 кДа до около 1 кДа.

«ЗФБ» означает зеленый флуоресцентный белок медузы Aequorea victoria.

«Гомологичный» относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одной и той же мономерной субъединицей нуклеотида или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы гомологичны в этом положении. Процент гомологии двух последовательностей является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений × 100. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления термин «гомологичный» относится к сходству последовательностей двух молекул полипептида или двух молекул нуклеиновой кислоты. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одной и той же мономерной субъединицей нуклеотида или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы гомологичны в этом положении. Гомология двух последовательностей является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то эти две последовательности гомологичны на 60%. Например, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC гомологичны на 50%.

Термин «гомология», когда он используется в отношении нуклеиновых кислот, относится к степени комплементарности. Может быть частичная гомология или полная гомология и, следовательно, идентичность. «Идентичность последовательностей» относится к мере сходства двух или более нуклеиновых кислот и выражается в процентах по отношению к общей длине сравнения. При расчете идентичности учитывают те нуклеотидные остатки, которые идентичны и находятся в одинаковых относительных положениях в своих соответствующих больших последовательностях.

«Гомологичная рекомбинация» относится к событию замены сегмента ДНК другим, который имеет идентичные области (гомологичные) или почти такие же. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «гомологическая рекомбинация» относится к типу генетической рекомбинации, при котором происходит обмен последовательностями нуклеотидов между двумя сходными или идентичными молекулами ДНК. Вкратце, гомологичная рекомбинация наиболее широко используется

клетками для точного восстановления вредных разрывов, возникающих на обеих цепях ДНК, известных как двухцепочечные разрывы. Хотя гомологичная рекомбинация широко варьируется среди разных организмов и типов клеток, большинство форм включает одни и те же основные этапы: после того, как происходит двухцепочечный разрыв, участки ДНК вокруг 5'-концов разрыва вырезаются в процессе, называемом резекцией. На последующем этапе проникновения в цепь выступающий 3'-конец разорванной молекулы ДНК затем «вторгается» в подобную или идентичную молекулу ДНК, которая не разорвана. После вторжения цепи дальнейшая последовательность событий может следовать либо по двум основным путям, т.е. по пути репарации двухцепочечного разрыва, либо по пути зависимого от синтеза отжига цепи. Гомологическая рекомбинация сохраняется во всех трех царствах живых организмов, а также у вирусов, что позволяет предположить, что это почти универсальный биологический механизм.Например, в некоторых вариантах осуществления гомологичная рекомбинация может происходить с использованием последовательности сайт-специфической интеграции (SSI, англ.: site-specific integration), в результате чего происходит кроссинговер с обменом цепями между последовательностями нуклеиновых кислот, по сути сходными по нуклеотидному составу. Эти события кроссинговера могут иметь место между последовательностями, содержащимися в нацеливающей конструкции по изобретению (т.е. последовательностью SSI), и последовательностями эндогенных геномных нуклеиновых кислот (например, полинуклеотидом, кодирующим пептидную субъединицу). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления возможно, что может произойти более одного события сайт-специфической гомологичной рекомбинации, что приведет к событию замены, при котором последовательности нуклеиновых кислот, содержащиеся в нацеливающей конструкции, заменяют определенные последовательности, присутствующие в эндогенных геномных последовательностях.

«Идентичность» относится к взаимосвязи между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, как определено путем сравнения указанных последовательностей. Термин «идентичность» также означает степень сходства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, в зависимости от случая, определяемую по совпадению между участками таких последовательностей. «Идентичность» и «сходство» могут быть легко рассчитаны любым из множества методов, известных специалистам в данной области техники, включая, помимо прочего, методы, описанные в: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994:, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в данный документе посредством ссылки в полном

объеме. Кроме того, методы определения идентичности и сходства кодифицированы в общедоступных компьютерных программах. Например, в некоторых вариантах осуществления способы определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, помимо прочего, программный пакет GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990). Программа BLAST X общедоступна в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990), содержание которых включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме.

«in vivo» относится к естественной среде (например, к животному или клетке) и к процессам или реакциям, происходящим в естественной среде.

«Неактивный» относится к состоянию, при котором что-то не находится в состоянии использования, например, бездействует и/или не работает. Например, при использовании в контексте гена или при обращении к гену термин «неактивный» означает, что указанный ген больше не синтезирует активно продукт гена, что указанный продукт гена не транслируется в белок или иным образом ген не выполняет свою нормальную функцию. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «неактивный» может относиться к нарушению транскрипции РНК геном, нарушению процессинга РНК (например, процессинга пре-мРНК, сплайсинга РНК или других посттранскрипционных модификаций); вмешательству в созревание некодирующей РНК; вмешательству в экспорт РНК (например, из ядра в цитоплазму); вмешательству в трансляцию; укладку белка; транслокацию; транспорт белка и/или ингибированию, и/или вмешательству в любую из молекул полинуклеотидов, пептидов, полипептидов, белков, факторов транскрипции, регуляторов, ингибиторов или других факторов, которые принимают участие в любом из вышеупомянутых процессов.

«Неработоспособный» относится к состоянию объекта, который не функционирует, неисправен или больше не может функционировать. Например, при использовании в контексте гена или со ссылкой на ген термин «неработоспособный» означает, что указанный ген больше не способен работать, как обычно, либо постоянно, либо временно. Например, «неработоспособный» в некоторых вариантах осуществления означает, что ген больше не способен синтезировать продукт гена, если указанный продукт гена транслируется в белок, или что ген не может выполнять свою нормальную функцию по иным причинам. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «неработоспособный» может относиться к нарушению транскрипции РНК геном, нарушению процессинга РНК (например, процессинга пре-мРНК, сплайсинга РНК или других посттранскрипционных модификаций); вмешательству в созревание некодирующей РНК; вмешательству в экспорт РНК (например, из ядра в цитоплазму); вмешательству в трансляцию; укладку белка; транслокацию; транспорт белка и/или ингибированию, и/или вмешательству в любую из молекул полинуклеотидов, пептидов, полипептидов, белков, факторов транскрипции, регуляторов, ингибиторов или других

факторов, которые принимают участие в любом из вышеупомянутых процессов.

«Насекомое» включает все организмы класса «Insecta». Термин «пред-взрослые» насекомые относится к любой форме организма до взрослой стадии, включая, например, яйца, личинки и нимфы. Используемый в данном документе термин «насекомое» относится к любым членистоногим и нематодам, включая акарид, и насекомым, которые, как известно, заражают все сельскохозяйственные культуры, овощи и деревья, и включает насекомых, которые считаются вредителями в области лесного хозяйства, садоводства и сельского хозяйства. Примерами конкретных культур, которые могут быть защищены описанными в данном документе способами, являются соя, кукуруза, хлопок, люцерна и овощные культуры. Перечень конкретных культур и насекомых прилагается.

«Инсектицидная активность» означает, что при или после воздействия на насекомое соединений, агентов или пептидов насекомое либо умирает, либо прекращает свое движение, либо замедляет его; прекращает или замедляет свое питание; прекращает или замедляет свой рост; у него нарушается поведение (например, в отношении навигации, поиска пищи, поведения во время сна и/или спаривания); не окукливается; имеет нарушение размножения; и/или не дает насекомому производить потомство и/или препятствует получению насекомым фертильного потомства.

«Кишечная среда насекомых» или «кишечная среда» означает специфические условия pH и протеиназы, обнаруженные в передней, средней или задней кишке насекомого или личинки насекомого.

«Среда гемолимфы насекомых» означает специфические условия pH и протеиназы внутри насекомого или личинки насекомого.

«Интегративный вектор экспрессии» или «интегративный вектор» означает вектор экспрессии дрожжей, который может встраиваться в определенный локус генома дрожжевой клетки и стабильно становится частью генома дрожжей.

«Промежуточный линкер» относится к короткой пептидной последовательности в белке, разделяющей различные части белка, или к короткой последовательности ДНК, которая помещается в рамку считывания в ОРС для разделения выше и ниже расположенных последовательностей ДНК. Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать промежуточный линкер, позволяющий белкам достичь независимого образования вторичной и третичной структуры во время трансляции. В некоторых вариантах осуществления промежуточный линкер может быть либо устойчивым, либо восприимчивым к расщеплению в клеточной среде растений, в кишечной среде насекомых и/или чешуекрылых и в среде гемолимфы насекомых и гемолимфы чешуекрылых.

«Выделенный» относится к отделению объекта и/или компонента от его естественной среды, например, токсин, выделенный из данного рода или вида, означает, что токсин отделен от его естественной среды.

Термин «т.п.н.» означает тысячу пар нуклеотидов, то есть 1000 нуклеотидов. Используемый в данном документе термин «т.п.н.» означает длину молекул нуклеиновой

кислоты. Например, 1 т.п.н относится к молекуле нуклеиновой кислоты длиной 1000 нуклеотидов. Длина двухцепочечной ДНК длиной 1 т.п.н. содержит две тысячи нуклеотидов (т. е. по тысяче на каждой цепи). Альтернативно, длина одноцепочечной РНК длиной 1 т.п.н. содержит одну тысячу нуклеотидов.

Термин «кДа» означает килодальтон, единицу, равную 1000 дальтон; «Дальтон» - это единица молекулярной массы (ММ).

«Нокин» или «нок-ин» или «процесс нок-ина» относится к замене эндогенного гена экзогенным или гетерологичным геном, или их частью. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «нок-ин» относится к введению последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей желаемый белок, в локус гена-мишени путем гомологичной рекомбинации, тем самым вызывая экспрессию желаемого белка. В некоторых вариантах осуществления мутация «нок-ин» может модифицировать последовательность гена для создания мутации с потерей или приобретением функции. Термин «нок-ин» может относиться к процедуре, с помощью которой экзогенная или гетерологичная полинуклеотидная последовательность или ее фрагмент вводятся в геном (например, «они осуществили нок-ин» или «они вставили путем нок-ина гетерологичный ген»), или результирующей клетке и/или организму (например, «клетка «нок-ин» или «животное «нок-ин»).

«Нок аут» или «нокаут», или «нок-аут», или «нокаутировать» относится к частичному или полному подавлению продукта экспрессии гена (например, мРНК) белка, кодируемого эндогенной последовательностью ДНК в клетке. В некоторых вариантах осуществления «нок-аут» может быть осуществлен путем направленной делеции всего гена или части гена, кодирующего пептид, полипептид или белок. В результате делеция может сделать ген неактивным, частично неактивным, неработоспособным, частично неработоспособным или иным образом уменьшить экспрессию гена или его продуктов в любой клетке организма и/или клетке, в которой он обычно экспрессируется. Термин «нок-аут» может относиться к процедуре, с помощью которой эндогенный ген делается полностью или частично неактивным или неработоспособным (например, «они осуществили нок-аут» или «они нокаутировали эндогенный ген»), или результирующей клетке и/или организму (например, «клетка является «нокаутной» или «животное является «нокаутным»).

«Нокдаун-доза 50» или «KD_{50}» относится к средней дозе, необходимой для того, чтобы вызвать паралич или прекращение движений у 50% популяции, например популяции Musca domestica (обычная комнатная муха) и/или Aedes aegypti (комар).

«l» или «*линкер*» относится к нуклеотиду, кодирующему промежуточный линкерный пептид.

«L» в соответствующем контексте относится к промежуточному линкерному пептиду, который связывает стабилизирующий трансляцию белок (STA, англ.: translational stabilizing protein), с дополнительным полипептидом, например, TVP и/или несколькими TVP. Когда речь идет об аминокислотах, «L» также может означать лейцин.

«Промотор LAC4» или «промотор Lac4» относится к сегменту ДНК, состоящему из промоторной последовательности, полученной из гена β-галактозидазы K. lactis. Промоторы LAC4 являются сильными и индуцируемыми репортерами, которые используются для управления экспрессией экзогенных генов, трансформированных в дрожжи.

«Терминатор LAC4» или «терминатор Lac4» относится к сегменту ДНК, состоящему из последовательности терминатора транскрипции, полученной из гена β-галактозидазы K. lactis.

«$ЛД_{20}$» относится к дозе, необходимой для уничтожения 20% популяции.

«$ЛД_{50}$» относится к летальной дозе 50, что означает дозу, необходимую для уничтожения 50% популяции.

«Кишечная среда чешуекрылых» означает специфические условия pH и протеиназы, обнаруженные в передней, средней или задней кишке чешуекрылого насекомого или личинки.

«Среда гемолимфы чешуекрылых» означает специфические условия pH и протеиназы внутри чешуекрылого насекомого или личинки.

«Линкер», или «LINKER», или «пептидный линкер», или «L», или «промежуточный линкер» относится к короткой пептидной последовательности, способной связывать вместе два пептида. Линкер также может относиться к короткой последовательности ДНК, которая помещается в рамку считывания ОРС для разделения выше и ниже расположенных последовательностей ДНК. В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться протеазой насекомых. В некоторых вариантах осуществления линкер может позволять белкам достигать независимого образования вторичной и третичной структур во время трансляции. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть либо устойчивым, либо восприимчивым к расщеплению в клеточной среде растений, в кишечной среде насекомых и/или чешуекрылых и в среде гемолимфы насекомых и гемолимфы чешуекрылых. В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться протеазой, например, в некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться растительной протеазой (например, папаином, бромелаином, фицином, актинидином, зингибаином и/или кардозином), протеазой насекомых, протеазой грибов, протеазой позвоночных, протеазой беспозвоночных, протеазой бактерий, протеазой млекопитающих, протеазой рептилий или протеазой птиц. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит бинарную или третичную область, где каждая область расщепляется по меньшей мере двумя типами протеаз: одна из которых представляет собой протеазу насекомых и/или нематод, а другая представляет собой протеазу человека. В некоторых вариантах осуществления линкер может выполнять одну из (по меньшей мере) трех функций: расщепляться в кишечной среде насекомого, расщепляться в растительной клетке или может быть сконструирован таким образом, чтобы не расщепляться

преднамеренно.

«Среда» (множественное число «среды») относится к питательному раствору для культивирования клеток в клеточной культуре.

«МОА» относится к механизму действия (англ.: mechanism of action).

«Молекулярная масса (ММ)» относится к массе или весу молекулы и обычно измеряется в «дальтонах (Да)» или килодальтонах (кДа). В некоторых вариантах осуществления ММ может быть рассчитана с использованием электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ), аналитического ультрацентрифугирования или рассеяния света. В некоторых вариантах осуществления метод ДСН-ПААГ выглядит следующим образом: представляющий интерес образец разделяют на геле с набором стандартов молекулярной массы. Образец анализируют, а затем гель обрабатывают желаемым красителем с последующим обесцвечиванием в течение примерно от 2 до 14 часов. Следующим шагом является определение относительного пройденного расстояния (Rf) стандартов и интересующего белка. Пройденное расстояние можно определить с помощью следующего уравнения:

$$Rf = \frac{\text{Пройденное расстояние белка}}{\text{Пройденное расстояние фронта красителя}}$$

Формула (III)

Далее можно определить логарифм ММ на основе значений, полученных для полос в стандарте; например, в некоторых вариантах осуществления логарифм молекулярной массы ДСН-денатурированного полипептида и его относительное пройденное расстояние (Rf) нанесены на график. После построения графика интерполяция полученного значения даст молекулярную массу полосы неизвестного белка.

«Мотив» относится к полинуклеотидной или полипептидной последовательности, которая имеет определенное биологическое значение и/или оказывает некоторый эффект или участвует в каком-либо биологическом процессе.

«Сайт множественного клонирования» или «СМК» относится к сегменту ДНК, обнаруженному на векторе, который содержит многочисленные сайты рестрикции, в которые может быть вставлена интересующая последовательность ДНК.

«Мутант» относится к организму, последовательности ДНК, аминокислотной последовательности, пептиду, полипептиду или белку, который имеет изменение или вариацию (например, в нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности), что приводит к тому, что указанный организм и/или последовательность отличаются от природного организма или организма дикого типа, последовательности дикого типа и/или эталонной последовательности, с которой сравнивают мутант. В некоторых вариантах осуществления это изменение или вариант может представлять собой замену или модификацию одного или нескольких нуклеотидов и/или аминокислот (например, делецию или добавление). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен или модификаций могут быть консервативными; в данном случае такая консервативная аминокислотная замена и/или

модификация в «мутанте» существенно не снижает активность мутанта по сравнению с его немутантной формой. Например, в некоторых вариантах осуществления «мутант» содержит одну или несколько консервативных аминокислотных замен по сравнению с пептидом с описанной и/или заявленной последовательностью, указанной в SEQ ID NO.

«N-концевой» относится к свободной аминогруппе (т.е. $-NH_2$), которая расположена в начале полипептида.

Термин «NCBI» относится к Национальному центру биотехнологической информации.

Термин «нм» относится к нанометрам.

«Нормализованный выход пептида» означает выход пептида в кондиционированной среде, деленный на соответствующую плотность клеток в момент измерения выхода пептида. Выход пептида может быть представлен массой продуцируемого пептида в единице объема, например, мг на литр или мг/л, или площадью пика УФ-поглощения продуцируемого пептида на ВЭЖХ-хроматографе, например, мЕА*сек. Плотность клеток может быть представлена поглощением культурой видимого света при длине волны 600 нм (OD600).

Термин «OD» относится к оптической плотности. Обычно OD измеряют с помощью спектрофотометра. При измерении роста клеточной популяции с течением времени OD600 предпочтительнее УФ-спектроскопии; это связано с тем, что при длине волны 600 нм клетки не пострадают, как при слишком большом количестве ультрафиолетового света.

«OD660 нм» или «$OD_{660\ нм}$» относится к оптической плотности при 660 нанометрах (нм).

«Однобуквенный код» означает пептидную последовательность, которая указана в ее однобуквенном коде для различения разных аминокислот в первичной структуре белка: аланин=A, аргинин=R, аспарагин=N, аспарагиновая кислота=D, аспарагин или аспарагиновая кислота=B, цистеин=C, глутаминовая кислота=E, глутамин=Q, глутамин или глутаминовая кислота=Z, глицин=G, гистидин=H, изолейцин=I, лейцин=L, лизин=K, метионин=M, фенилаланин=F, пролин=P, серин=S, треонин=T, триптофан=W, тирозин=Y и валин=V.

«Способный» относится к возможности использования, способности что-то делать и/или способности выполнять какую-либо функцию или результат. Например, в некоторых вариантах осуществления «способный» относится к способности полинуклеотида, последовательности ДНК, последовательности РНК или другой последовательности нуклеотидов или гена кодировать пептид, полипептид и/или белок. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может кодировать белок, что означает, что полинуклеотид содержит информацию, которая наделяет его способностью создавать белок (например, путем транскрипции мРНК, которая, в свою очередь, транслируется в белок).

«Функционально связанный» относится к взаимному расположению, при котором

описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Например, в некоторых вариантах осуществления функционально связанные могут относиться к двум или более ДНК, пептидным или полипептидным последовательностям. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «функционально связанный» может означать, что две соседние последовательности ДНК расположены вместе таким образом, что активация транскрипции одной из них может воздействовать на другую. В других вариантах осуществления термин «функционально связанный» может относиться к молекулам пептида и/или полипептида, например, при этом функционально связанный означает, что две или более молекулы пептида и/или полипептида соединены таким образом, что образуется одна полипептидная цепь, или связаны таким образом, что один пептид оказывает некоторое влияние на другой. В еще других вариантах осуществления функционально связанные последовательности могут относиться к двум соседним последовательностям ДНК, помещенным вместе таким образом, что активация транскрипции одной из них может воздействовать на другую. В других вариантах осуществления функционально связанный может относиться к молекулам пептида и/или полипептида, например, при этом две или более молекулы пептида и/или полипептида соединены таким образом, что образуется одна полипептидная цепь, или связаны таким образом, что один пептид оказывает некоторое влияние на другой.

«ОРС» или «открытая рамка считывания» относится к длине последовательности РНК или ДНК между сигналом начала трансляции (например, AUG или ATG, соответственно) и любым одним или несколькими известными кодонами терминации, которые кодируют один или несколько полипептидных последовательностей. Иными словами, ОРС описывает систему отсчета с точки зрения рибосомы, транслирующей код РНК, поскольку рибосома способна продолжать считывание (т. е. добавлять аминокислоты к образующемуся белку), поскольку она не встретила стоп-кодон. Таким образом, «открытая рамка считывания» или «ОРС» относится к аминокислотной последовательности, закодированной между кодонами инициации и терминации трансляции кодирующей последовательности. В данном случае термины «кодон инициации» и «кодон терминации» относятся к единице из трех соседних нуклеотидов (т. е. кодону) в кодирующей последовательности, которая определяет инициацию и терминацию цепи, соответственно, синтез белка (трансляции мРНК).

В некоторых вариантах осуществления ОРС представляет собой непрерывный участок кодонов, который начинается со стартового кодона (обычно ATG для ДНК и AUG для РНК) и заканчивается стоп-кодоном (обычно UAA, UAG или UGA). В других вариантах осуществления ОРС может представлять собой длину последовательности РНК или ДНК между сигналом начала трансляции (например, AUG или ATG) и любым одним или несколькими известными кодонами терминации, причем указанная длина последовательности РНК или ДНК кодирует одну или несколько полипептидных последовательностей. В некоторых других вариантах ОРС может представлять собой

последовательность ДНК, кодирующую белок, который начинается с стартового кодона ATG и заканчивается стоп-кодоном TGA, TAA или TAG. ОРС также может означать транслируемый белок, который кодирует ДНК. Как правило, специалисты в данной области техники отличают термины «открытая рамка считывания» и «ОРС» от термина «кодирующая последовательность» на основании того факта, что самое широкое определение «открытой рамки считывания» просто предполагает серию кодонов, которая не содержит стоп-кодона. Соответственно, в то время как ОРС может содержать интроны, кодирующая последовательность отличается тем, что относится к тем нуклеотидам (например, конкатенированным экзонам), которые могут быть разделены на кодоны, которые фактически транслируются в аминокислоты с помощью рибосомного механизма трансляции (т. е. кодирующая последовательность не содержат интронов); однако используемые в данном документе термины «кодирующая последовательность»; «CDS»; «открытая рамка считывания»; и «ОРС» взаимозаменяемы.

«Аут-рекомбинированный» или «аут-рекомбинация» относится к удалению гена и/или полинуклеотидной последовательности (например, эндогенного гена), которая окружена двумя сайт-специфическими сайтами рекомбинации (например, 5'- и 3'-нуклеотидной последовательностью гена-мишени, которая гомологична гомологическим плечам вектора-мишени) во время гомологичной рекомбинации in vivo. См. «нокаут».

«Вредитель» включает, помимо прочего: насекомых, грибки, бактерии, нематоды, клещей, и т.п.

«Пестицидно-эффективное количество» относится к количеству пестицида, которое способно вызвать гибель по меньшей мере одного вредителя или заметно уменьшить рост, питание или нормальное физиологическое развитие вредителя. Это количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как, например, конкретные целевые вредители, с которыми необходимо бороться, конкретная среда, местоположение, подлежащие обработке растения, сельскохозяйственные культуры или сельскохозяйственные угодья, условия окружающей среды и метод, скорость, концентрация, стабильность и количество нанесенной пестицидно-эффективной полипептидной композиции. Составы также могут различаться в зависимости от климатических условий, экологических соображений и/или частоты применения и/или серьезности заражения вредителями.

«Фармацевтически приемлемая соль» является синонимом сельскохозяйственно приемлемой соли и в данном контексте относится к соединению, которое модифицировано путем получения его солей с кислотами или основаниями.

«Растение» означает целые растения, ткани растений, органы растений (например, листья, стебли, корни и т. д.), семена, клетки растений, пропагулы, зародыши и их потомство. Клетки растений могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллус, клетки суспензионной культуры, протопласты, клетки листа, клетки корня, клетки флоэмы и пыльца).

«Трансгенный белок растений» означает белок гетерологичного вида, который

экспрессируется в растении после того, как кодирующая его ДНК или РНК была доставлена в одну или несколько клеток растения.

«Плазмида» относится к сегменту ДНК, который действует как носитель представляющего интерес гена (например, tvp) и при трансформации или трансфекции в организм может реплицироваться и экспрессировать последовательность ДНК, содержащуюся в плазмиде, независимо от организма-хозяина. Плазмиды представляют собой тип вектора и могут быть «клонирующими векторами» (т.е. простыми плазмидами, используемыми для клонирования фрагмента ДНК и/или выбора популяции хозяев, несущих плазмиду, с помощью какого-либо индикатора селекции) или «экспрессионными плазмидами» (т.е. плазмидами, используемыми для получения больших количеств полинуклеотидов и/или полипептидов).

«Полинуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов (например, рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов или их аналогов) любой длины; например, последовательности из двух или более рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов. Используемый в данном документе термин «полинуклеотид» включает двухцепочечную и одноцепочечную ДНК, а также двухцепочечную и одноцепочечную РНК; он также включает модифицированные и немодифицированные формы полинуклеотида (модификации полинуклеотида, например, могут включать метилирование, фосфорилирование и/или кэпирование). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может быть одним из следующих: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, EST или метка SAGE); геномная ДНК; фрагмент геномной ДНК; экзон; интрон; матричная РНК (мРНК); транспортная РНК; рибосомальная РНК; рибозим; кДНК; рекомбинантный полинуклеотид; разветвленный полинуклеотид; плазмида; вектор; выделенная ДНК любой последовательности; выделенная РНК любой последовательности; зонд нуклеиновой кислоты; праймер или амплифицированная копия любого из вышеперечисленного.

В других вариантах осуществления полинуклеотид может относиться к полимерной форме нуклеотидов, способной кодировать открытую рамку считывания гена.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может относиться к кДНК.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. На структуру полинуклеотида также можно ссылаться по его 5'- или 3'-концу или концу, что указывает на направленность полинуклеотида. Соседние нуклеотиды в одной цепи полинуклеотидов обычно соединены фосфодиэфирной связью между их 3'- и 5'-атомами углерода. Однако можно также использовать различные межнуклеотидные связи, такие как связи, включающие метиленовые, фосфорамидатные связи и т. д. Это означает, что соответствующие 5'- и 3'-атомы углерода могут быть экспонированы на любом конце полинуклеотида, который можно назвать 5'- и 3'-концами или концом. 5’- и 3’-концы можно также назвать фосфорильными (PO_4) и гидроксильными (OH) концами, соответственно, из-за химических групп, присоединенных к этим концам. Термин

полинуклеотид также относится как к двухцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если не указано или не предусмотрено иное, любой вариант осуществления, в котором создают или используют полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, о которых известно или предполагается, что они составляют двухцепочечную форму.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов (включая нуклеотиды с неприродными основаниями, нуклеотиды с модифицированными природными основаниями, такие как аза- или деазапурины и т.д.). Модификации нуклеотидной структуры, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид также может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Кроме того, последовательность нуклеотидов в полинуклеотиде может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Один или несколько концов полинуклеотида могут быть защищены или иным образом модифицированы для предотвращения взаимодействия этого конца определенным образом (например, образования ковалентной связи) с другими полинуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может состоять из определенной последовательности четырех нуклеотидных оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G) и тимина (T). Урацил (U) также может присутствовать, например, в качестве естественной замены тимина, когда полинуклеотидом является РНК. Урацил также может быть использован в ДНК. Таким образом, термин «последовательность» относится к алфавитному представлению полинуклеотида или любой молекулы нуклеиновой кислоты, включая природные и неприродные нуклеотиды.

Термин «молекула РНК» или молекула рибонуклеиновой кислоты относится к полинуклеотиду, имеющему в качестве одного из пиримидиновых оснований сахар рибозы, а не сахар дезоксирибозы, и обычно урацил, а не тимин. Молекула РНК по изобретению обычно является одноцепочечной, но также может быть двухцепочечной. В контексте молекулы РНК из образца РНК молекула РНК может включать одноцепочечные молекулы, транскрибированные с ДНК в ядре клетки, митохондрии или хлоропласте, которые имеют линейную последовательность нуклеотидных оснований, комплементарную цепи ДНК, из которой они транскрибируются.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может дополнительно содержать один или несколько гетерологичных регуляторных элементов. Например, в некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент представляет собой один или несколько промоторов; энхансеров; сайленсеров; операторов; сигналов сплайсинга; сигналов полиаденилирования; сигналов терминации; элементов экспорта РНК, внутренних сайтов посадки рибосом (IRES); последовательностей поли-U; или их комбинации.

«Посттранскрипционные регуляторные элементы» представляют собой сегменты ДНК и/или механизмы, влияющие на мРНК после ее транскрипции. Механизмы посттранскрипционных механизмов включают события сплайсинга; кэпирование, сплайсинг и добавление поли(А)-хвоста, и другие механизмы, известные специалистам в данной области техники.

«Промотор» относится к области ДНК, с которой связывается РНК-полимераза и инициирует транскрипцию гена.

«Белок» имеет то же значение, что и «пептид» и/или «полипептид» в этом документе.

«Отношение» относится к количественному соотношению между двумя величинами, показывающему, сколько раз одно значение содержит или содержится в другом.

«Рамка считывания» относится к одной из шести возможных рамок считывания, по три в каждом направлении, двухцепочечной молекулы ДНК. Используемая рамка считывания определяет, какие кодоны используются для кодирования аминокислот в кодирующей последовательности молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления рамка считывания представляет собой способ разделения последовательности нуклеотидов в полинуклеотиде и/или нуклеиновой кислоте (например, ДНК или РНК) на набор последовательных неперекрывающихся триплетов.

«Рекомбинантная ДНК» или «рДНК» относится к ДНК, состоящей из двух или более различных сегментов ДНК.

«Рекомбинантный вектор» означает ДНК-плазмидный вектор, в который встроена чужеродная ДНК.

«Регуляторные элементы» относятся к генетическому элементу, который контролирует некоторые аспекты экспрессии и/или процессинга последовательностей нуклеиновых кислот. Например, в некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть обнаружен на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Регуляторные элементы могут быть цис-регуляторными элементами (CRE, англ.: cis-regulatory elements) или трансрегуляторными элементами (TRE, англ.: trans-regulatory elements). В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может представлять собой один или несколько промоторов; энхансеров; сайленсеров; операторов; сигналов сплайсинга; сигналов полиаденилирования; сигналов терминации; элементов экспорта РНК, внутренних сайтов посадки рибосом (IRES); последовательностей поли-U и/или другие элементы, которые влияют на экспрессию генов, например, тканеспецифическим образом; временно-зависимым образом; увеличивают или уменьшают экспрессию и/или вызывают конститутивную экспрессию.

«Фермент рестрикции» или «рестрикционная эндонуклеаза» относится к ферменту, который расщепляет ДНК по определенному сайту рестрикции. Например, фермент рестрикции может расщеплять плазмиду по сайту рестрикции EcoRI, SacII или BstXI, обеспечивая линеаризацию плазмиды и лигирование представляющей интерес

ДНК.

«Сайт рестрикции» относится к участку ДНК, содержащему последовательность из 4-8 нуклеотидов, последовательность которого распознается конкретным ферментом рестрикции.

«Селективный ген» означает ген, который дает генетически модифицированному организму преимущество расти под давлением отбора.

«Серовары» или «серотипы» относятся к группе близкородственных микроорганизмов, отличающихся характерным набором антигенов. В некоторых вариантах осуществления серовары представляют собой антигенно и серологически отличные разновидности микроорганизмов.

Термин “sp.” относится к видам.

Термины “ssp.” или “subsp.” относятся к подвидам.

«Субклонирование» или «субклонированный» относится к процессу переноса ДНК из одного вектора в другой, обычно предпочтительный вектор. Например, полинуклеотид, кодирующий мутантный TVP, может быть субклонирован в плазмиду pKlac1 после отбора колоний дрожжей, трансформированных плазмидами pKLAC1.

«SSI» - это аббревиатура, зависящая от контекста. В некотором контексте она может относиться к «сайт-специфической интеграции», которая используется для обозначения последовательности, которая позволяет происходить гомологичной рекомбинации in vivo. Однако в другом контексте SSI может относиться к «распылению на поверхности внутри помещений», что представляет собой метод нанесения распыляемого объема инсектицида с переменным объемом на поверхности внутри помещений, где находятся переносчики, например, на стенах, окнах, полах и потолках. Термин «сайт-специфическая интеграция» относится к процессу, направляющему трансген к целевому сайту в геноме организма-хозяина; таким образом, SSI позволяет интегрировать интересующие гены в предварительно выбранные участки генома организма-хозяина.

«STA» или «стабилизирующий трансляцию белок», или «стабилизирующий домен», или «стабилизирующий белок» (используемые в данном документе взаимозаменяемо) означает пептид или белок с достаточной третичной структурой, чтобы он мог накапливаться в клетке, не подвергаясь клеточному процессу деградации белка. Белок может иметь длину от 5 до 50 аминокислот. Стабилизирующий трансляцию белок кодируется последовательностью ДНК белка, который функционально связан с последовательностью, кодирующей инсектицидный белок или TVP в ОРС. Функционально связанный STA может располагаться выше или ниже TVP и может иметь любую промежуточную последовательность между двумя последовательностями (STA и TVP) до тех пор, пока промежуточная последовательность не приводит к сдвигу рамки ни одной из последовательностей ДНК. Стабилизирующий трансляцию белок также может обладать активностью, которая увеличивает доставку TVP через стенку кишечника в гемолимфу насекомого.

Термин «sta» означает нуклеотид, кодирующий стабилизирующий трансляцию белок.

«Структурный мотив» относится к трехмерному расположению пептидов и/или полипептидов, и/или расположению функционально связанных полипептидных сегментов. Например, полипептид, имеющий мотив СПЭР (англ.: ERSP), мотив STA, мотив LINKER и мотив полипептида TVP, имеют общий «структурный мотив» ERSP-STA-L-TVP. *См. также* «конструкт TVP»

«Ta1b», или «U1-агатоксин-Ta1b», или «Ta1bWT», или «U1-агатоксин-Ta1b дикого типа» относится к полипептиду, выделенному из паука-бродяги, Eratigena agrestis. Одним из примеров U1-агатоксин-Ta1b является полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 (номер доступа NCBI № O46167.1).

«Вариант полинуклеотида Ta1b» или «вариант полинуклеотида U1-агатоксин-Ta1b» относится к полинуклеотиду или группе полинуклеотидов, способных экспрессировать и/или кодировать инсектицидный белок, содержащий один или несколько TVP. Термин «вариант полинуклеотида U1-агатоксин-Ta1b», используемый для описания полинуклеотидной последовательности варианта U1-агатоксин-Ta1b, содержащейся в ОРС экспрессии TVP, ее включения в вектор и/или при описании полинуклеотидов, кодирующих инсектицидный белок, описывается как «tvp» и/или «Tvp».

«Токсин» относится к яду и/или отраве, особенно к белку или конъюгированному белку, вырабатываемому некоторыми животными, высшими растениями и патогенными бактериями. Как правило, термин «токсин» относится к природным продуктам, например, молекулам и пептидам, обнаруженным в скорпионах, пауках, змеях, ядовитых грибах и т. д., тогда как термин «токсикант» используют для искусственных продуктов и/или искусственных продуктов, например, искусственных химических пестицидов. Однако в настоящем документе термины «токсин» и «токсикант» используются как синонимы.

«Трансфекция» и «трансформация» относятся к процессу введения экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК (например, вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий TVP) в организм-хозяина (например, прокариот или эукариот). Как правило, специалисты в данной области техники иногда используют термин «трансформация» для описания процессов, при которых экзогенная и/или гетерологичная ДНК или РНК вводятся в бактериальную клетку; и используют термин «трансфекция» для процессов, описывающих введение экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК в эукариотические клетки. Однако в настоящем документе термины «трансформация» и «трансфекция» используются как синонимы, независимо от того, описывает ли процесс введение экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК в прокариоты (например, бактерии) или эукариоты (например, дрожжи, растения или животных).

«Трансген» означает гетерологичную последовательность ДНК, кодирующую белок, который трансформируется в растение.

«Трансгенная клетка-хозяин» означает клетку, которая трансформирована геном и была отобрана по ее трансгенному статусу посредством дополнительного гена селекции.

«Трансгенное растение» означает растение, полученное из одной клетки, трансформированной чужеродной ДНК таким образом, что каждая клетка растения содержит этот трансген.

«Система транзиторной экспрессии» означает систему на основе Agrobacterium tumefaciens, которая доставляет ДНК, кодирующую обезвреженный вирус растения, в клетку растения, где он экспрессируется. Вирус растений был сконструирован так, чтобы экспрессировать интересующий белок в высоких концентрациях, до 40% ОРБ.

Тройная кассета экспрессии относится к трем кассетам экспрессии TVP, содержащимся в одном векторе.

«TRBO» означает временную систему экспрессии растений с использованием вируса табачной мозаики с удалением гена белка оболочки вируса.

«ОРБ» или «общий растворимый белок» означает общее количество белка, которое может быть экстрагировано из образца растительной ткани и солюбилизировано в буфере для экстракции.

«TVP» или «варианты полипептида U1-агатоксин-Ta1b (TVP)» или «варианты полипептида Ta1b (TVP)» относятся к мутантам или вариантам полипептидной последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа и/или полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, который был изменен для получения не встречающегося в природе полипептида и/или полинуклеотидной последовательности. В настоящем документе предложена иллюстративная последовательность полипептида U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В настоящем документе предложена иллюстративная последовательность предшественника полипептида U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (номер доступа NCBI № O46167.1), которая включает сигнальную последовательность «MKLQLMICLVLLPCFFC» (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь аминокислотную последовательность, соответствующую любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных в Таблице 1. Соответственно, термин «TVP» относится к пептидам, имеющим одну или несколько мутаций относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ. ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь аминокислотную последовательность Формулы (I):

E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7

Формула (I)

при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A,

G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь аминокислотную последовательность Формулы (II):

E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G

Формула (II)

при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или ее фармацевтически приемлемую соль.

«Диаграмма ОРС TVP» относится к композиции одной или нескольких ОРС TVP, записанных в форме диаграммы или уравнения. Например, «диаграмма ОРС TVP» может быть записана с использованием акронимов или сокращенных ссылок на сегменты ДНК, содержащиеся в ОРС экспрессии. Соответственно, в одном примере «диаграмма ОРС TVP» может описывать полинуклеотидные сегменты, кодирующие СПЭР, LINKER, STA и TVP, посредством диаграммы в форме уравнения сегментов ДНК как «ersp» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид СПЭР); «linker» или «L» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид LINKER); «sta» (т. е. полинуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид STA) и «tvp» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая TVP), соответственно. Примером диаграммы ОРС TVP является «ersp-sta-($linker_i$-tvp_j)$_N$» или «ersp-(tvp_j-$linker_i$)$_N$-sta» и/или любая комбинация их сегментов ДНК.

«Полинуклеотид TVP» относится к полинуклеотиду или группе полинуклеотидов, способных экспрессировать и/или кодировать TVP или TVP-инсектицидный белок.

«TVP-инсектицидный белок» относится к любому белку, пептиду, полипептиду, аминокислотной последовательности, конфигурации или расположению, состоящему из: (1) по меньшей мере одного TVP или двух или более TVP; и (2) дополнительных нетоксичных пептидов, полипептидов или белков, при этом указанные дополнительные нетоксичные пептиды, полипептиды или белки, например, в некоторых вариантах осуществления, обладают способностью выполнять одно или несколько из следующих действий: повышать смертность и/или ингибировать рост насекомых, когда насекомые подвергаются воздействию TVP-инсектицидного белка, по сравнению только с TVP; повышать экспрессию указанного TVP-инсектицидного белка, например, в клетке-хозяине или системе экспрессии; и/или влиять на посттрансляционный процессинг TVP-инсектицидного белка. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может представлять собой полимер, содержащий два или более TVP. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может представлять собой полимер, содержащий два или более TVP, при этом TVP функционально связаны через линкерный пептид, например, расщепляемый и/или нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах

осуществления TVP-инсектицидный белок может относиться к одному или нескольким TVP, функционально связанным с одним или несколькими белками, такими как стабилизирующий домен (STA); сигнальный белок эндоплазматического ретикулума (СПЭР); расщепляемый насекомыми или нерасщепляемый насекомыми линкер (L) и/или любую другую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может представлять собой неприродный белок, содержащий (1) белок Ta1b дикого типа; и (2) дополнительные нетоксичные пептиды, полипептиды или белки, например, СПЭР; линкер; CTA; UBI или гистидинову метку, или аналогичный маркер.

«Конструкция TVP» относится к трехмерному расположению/ориентации пептидов, полипептидов и/или мотивов функционально связанных сегментов полипептидов (например, TVP-инсектицидного белка). Например, ОРС экспрессии TVP может включать один или несколько из следующих компонентов или мотивов: TVP; сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР); линкерный пептид (L); стабилизирующий трансляцию белок (STA) или любую их комбинацию. И используемый в данном документе термин «конструкция TVP» используется для описания обозначения и/или ориентации структурного мотива. Другими словами, конструкция TVP описывает расположение и ориентацию компонентов или мотивов, содержащихся в данной ОРС экспрессии TVP. Например, в некоторых вариантах осуществления конструкция TVP описывает, помимо прочего, ориентацию одного из следующих TVP-инсектицидных белков: ERSP-TVP; ERSP-$(TVP)_N$; ERSP-TVP-L; ERSP-$(TVP)_N$-L; ERSP-$(TVP-L)_N$; ERSP-L-TVP; ERSP-L-$(TVP)_N$; ERSP-$(L-TVP)_N$; ERSP-STA-TVP; ERSP-STA-$(TVP)_N$; ERSP-TVP-STA; ERSP-$(TVP)_N$-STA; ERSP-$(STA-TVP)_N$; ERSP-$(TVP-STA)_N$; ERSP-L-TVP-STA; ERSP-L-STA-TVP; ERSP-L-$(TVP-STA)_N$; ERSP-L-$(STA-TVP)_N$; ERSP-L-$(TVP)_N$-STA; ERSP-$(L-TVP)_N$-STA; ERSP-$(L-STA-TVP)_N$; ERSP-$(L-TVP-STA)_N$; ERSP-$(L-STA)_N$-TVP; ERSP-$(L-TVP)_N$-STA; ERSP-STA-L-TVP; ERSP-STA-TVP-L; ERSP-STA-L-$(TVP)_N$; ERSP-$(STA-L)_N$-TVP; ERSP-STA-$(L-TVP)_N$; ERSP-$(STA-L-TVP)_N$; ERSP-STA-$(TVP)_N$-L; ERSP-STA-$(TVP-L)_N$; ERSP-$(STA-TVP)_N$-L; ERSP-$(STA-TVP-L)_N$; ERSP-TVP-L-STA; ERSP-TVP-STA-L; ERSP-$(TVP)_N$-STA-L ERSP-$(TVP-L)_N$-STA; ERSP-$(TVP-STA)_N$-L; ERSP-$(TVP-L-STA)_N$ или ERSP-$(TVP-STA-L)_N$; при этом N представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200. *См. также* «Структурный мотив».

Термин «var.» относится к varietas или разновидности. Термин «var.» используется для обозначения таксономической категории, которая ранжируется ниже уровня вида и/или подвида (при наличии). В некоторых вариантах осуществления термин «var.» представляет представителей, отличающихся от других представителей того же подвида или вида незначительными, но постоянными или наследственными характеристиками.

«Вариант» или «вариант последовательности» или «вариант пептида» относится к аминокислотной последовательности, которая содержит одну или несколько консервативных аминокислотных замен или консервативных модификаций. Консервативные аминокислотные замены в «варианте» существенно не снижают

активность варианта по отношению к его неизмененной форме. Например, в некоторых вариантах осуществления «вариант» содержит одну или несколько консервативных аминокислотных замен по сравнению с пептидом с описанной и/или заявленной последовательностью, указанной в SEQ ID NO.

«Вектор» относится к сегменту ДНК, который принимает представляющий интерес чужеродный ген (например, tvp). Представляющий интерес ген известен как «вставка» или «трансген».

«Витрификация» относится к процессу превращения материала в стеклообразный аморфный материал. Стеклоподобное аморфное твердое вещество может не иметь какой-либо кристаллической структуры. Затвердевание стекловидного твердого вещества происходит при температуре стеклования (Tg).

«Дикий тип», «ДТ» или «WT» относится к фенотипу и/или генотипу (т.е. внешнему виду или последовательности) организма, полинуклеотидной последовательности и/или полипептидной последовательности, в том виде, в каком их находят и/или наблюдают в их естественном состоянии или условиях.

«Дрожжевой вектор экспрессии» или «вектор экспрессии», или «вектор» означает плазмиду, которая может вводить гетерологичный ген и/или кассету экспрессии в дрожжевые клетки для транскрипции и трансляции.

«Выход» относится к продукции пептида, и повышенный выход может означать повышенные объемы продукции, повышенные скорости продукции, а также повышенный средний или медианный выход и повышенную частоту при более высоком выходе. Термин «урожайность», когда он используется в отношении роста и/или производства сельскохозяйственных культур, как и «урожайность растения», относится к качеству и/или количеству биомассы, производимой растением.

В данном описании, если специально не указано иное или если контекст не требует иного, ссылка на одну стадию, композицию вещества, группу стадий или группу композиций вещества должна охватывать одну и множество (т. е. один или более) таких стадий, композиций вещества, групп стадий или групп композиций вещества.

Настоящее изобретение выполнено без ненужных экспериментов с использованием, если не указано иное, общепринятых методов молекулярной биологии, микробиологии, вирусологии, технологии рекомбинантной ДНК, твердофазного и жидкостного синтеза нуклеиновых кислот, синтеза пептидов в растворе, твердофазного синтеза пептидов, иммунологии, клеточной культуры и составов. Такие процедуры описаны, например, в Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), все тома I, II и III; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, весь текст; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, весь текст, и особенно статьи в нем Gait, pp1-22; Atkinson et al, pp35-81; Sproat et al, pp 83-115; и Wu et al, pp 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, весь текст;

Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, весь текст; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), вся серия; J. F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R. L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R. B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. and Merrifield, R. B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, 3. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wiinsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Metoden der Organischen Chemie (Muler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); и Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R. W. Masters, ed., 2000); каждый из этих документов полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Во данном описании, если контекст не требует иного, слово «содержать» или варианты, такие как «содержит» или «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанной стадии или элемента, или целого числа, или группы стадий, или элементов, или целых чисел, но не исключение любой другой стадии или элемента, или целого числа, или группы элементов или целых чисел.

Все патентные заявки, патенты и печатные публикации, упомянутые в настоящем документе, полностью включены путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны как включенные посредством ссылки в полном объеме. И все патентные заявки, патенты и печатные публикации, цитируемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, за исключением любых определений, заявлений об отказе от прав или отказов от ответственности в отношении объекта, и за исключением случаев, когда включенный материал не соответствует прямому описанию в данном документе, и в этом случае язык в этом описании имеет преимущественную силу.

U1-АГАТОКСИНЫ И TVP ДИКОГО ТИПА

«Пауки-бродяги» (Eratigena agrestis, ранее Tegenaria agrestis) это ядовитые пауки, принадлежащие к семейству пауков Agelenidae или ткачам воронкообразных паутин. *См.* Ingale A, Antigenic epitopes prediction and MHC binder of a paralytic insecticidal toxin (ITX-1) of Tegenaria agrestis (hobo spider). 4 August 2010 Volume 2010:2 pp 97-103. Считается, что яд пауков-бродяг обладает инсектицидной активностью. *См.* Johnson et al., Novel insecticidal peptides from Tegenaria agrestis spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. Arch Insect Biochem Physiol. 1998;38(1):19-31; Klint et al., Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis via Expression in the Periplasm of E. coli. PLoS One. 2013; 8(5): e63865.

Паук-бродяга, наряду с несколькими другими пауками семейства Agelenidae, производит яд, содержащий агатоксины, которые проявляют инсектицидную активность. Агатоксины представляют собой химически разнообразную группу токсинов, которые могут вызывать различные инсектицидные эффекты в зависимости от вида мишени; например, агатоксины вызывают вялотекущий спастический паралич у жесткокрылых, чешуекрылых и двукрылых; увеличивают скорость возбуждения нейронов в центральной нервной системе (ЦНС) комнатных мух (Musca domestica) и смертельны для других насекомых (например, мясной мухи, Lucilia cuprina). Соответственно, агатоксины вовлечены в нацеливание на ЦНС. *См.* Undheim et al., Weaponization of a hormone: convergent recruitment of hyperglycemic hormone into the venom of arthropod predators. Structure 23: 1283-1292 и Johnson et al., Novel insecticidal peptides from Tegenaria agrestis spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. Arch. Insect Biochem. Physiol. 38:19-31(1998).

Два типа агатоксинов включают U1-агатоксин-Ta1a и U1-агатоксин-Ta1b, оба являются членами семейства спиральных токсинов, полученных из нейропептидов членистоногих (HAND). Помимо пауков, эти токсины также можно найти в яде многоножек. Агатоксины являются эволюционными ответвлениями древнего семейства экдизозоанских гормонов, т. е. семейства пептидов переноса ионов/гипергликемических гормонов ракообразных (ITP/CHH). *См.* Undheim et al., Weaponization of a hormone: convergent recruitment of hyperglycemic hormone into the venom of arthropod predators. Structure 23: 1283-1292 и Johnson et al., Novel insecticidal peptides from Tegenaria agrestis spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. Arch. Insect Biochem. Physiol. 38:19-31(1998).

Токсин U1-агатоксин-Ta1b, полученный из паука-бродяги, имеет полную аминокислотную последовательность «MKLQLMICLVLLPCFFCEPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRND VYTACHEAQKG» (SEQ ID NO:48)», которая включает сигнальный пептид из положений аминокислот 1-17 и зрелый токсин из положений 18-68. Id. Белок состоит из четырех плотно упакованных α-спиралей без β-цепей, а молекулярная масса зрелого токсина составляет 5700,39 Дальтон (Да). Id.

Предложен типичный зрелый полипептид U1-агатоксин-Ta1b дикого типа из Eratigena agrestis, имеющий аминокислотную последовательность: «EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYTACHEAQKG» (SEQ ID NO:1).

Во время процессинга белка зрелый токсин U1-агатоксин-Ta1b дикого типа подвергается событию вырезания С-концевого глицина, давая следующую аминокислотную последовательность: EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYTACHEAQK (SEQ ID NO: 60). Последующее посттрансляционное событие приводит к образованию зрелого токсина U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, имеющего С-концевое амидирование.

Варианты полипептида U1-агатоксин-Ta1b (TVP) представляют собой мутанты или варианты, которые каким-то образом отличаются от U1-агатоксин-Ta1b дикого типа (SEQ ID NO:1), например, в некоторых вариантах осуществления эта вариация может представлять собой аминокислотную замену, делецию или добавление; или изменение полинуклеотида, кодирующего U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, приводящее к аминокислотной замене, делеции или добавлению. Результатом этой вариации является невстречающийся в природе полипептид и/или кодирующая его полинуклеотидная последовательность, которые обладают повышенной инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких видов насекомых по сравнению с U1-агатоксином-Ta1b дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, как показано в Таблице 1.

Таблица 1. TVP по настоящему изобретению.

Аминокислота SEQ ID NO	**Название**	**Аминокислотная последовательность**	**Нуклеотидная последовательность**
1	WT-Ta1b	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGACCAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGCTTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
2	TVP-R9Q	EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACCAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGCTTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
3	TVP-R9QΔG	EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACCAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
4	TVP-K18A	EPDEICRARMTNKE FTYASNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATgctTCCAACGTATGCAATAA TTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCT GCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
5	TVP-K18AΔG	EPDEICRARMTNKE FTYASNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATgctTCCAACGTATGCAATAA TTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCT GCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
6	TVP-R38A	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFAND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTgctAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
7	TVP-R38AΔG	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFAND VYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTgctAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
8	TVP-A8N	EPDEICRNRMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAaac AGGATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
9	TVP- A8NΔG	EPDEICRNRMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAaac AGGATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
10	TVP-A8S	EPDEICRSRMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAtca AGGATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
11	TVP- A8SΔG	EPDEICRSRMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAtca AGGATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
12	TVP-R9N	EPDEICRANMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AaacATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
13	TVP- R9NΔG	EPDEICRANMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AaacATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
14	TVP-T11P	EPDEICRARMPNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGcctAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
15	TVP- T11PΔG	EPDEICRARMPNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGcctAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
49	TVP-T43A	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYAACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgctGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
50	TVP- T43AΔG	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYAACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgctGCTTGTCACGA GGCTCAGAAA
51	TVP- R9Q/T43A	EPDEICRAQMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYAACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AcaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACgcaGCTTGTCACGAG GCTCAGAAAGGT
52	TVP-R9Q/T43A/ ΔG	EPDEICRAQMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYAACHEAQK	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AcaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACgctGCTTGTCACGAG GCTCAGAAA
53	TVP-R9Q/T43A/ ΔK-G	EPDEICRAQMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYAACHEAQ	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AcaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACgctGCTTGTCACGAG GCTCAG
77	TVP-R9A	EPDEICRAAMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AgcaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
78	TVP-R9G	EPDEICRAGMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AggaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
79	TVP-R9N	EPDEICRANMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AaatATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
80	TVP-R9L	EPDEICRALMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC ActaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
81	TVP-R9D	EPDEICRADMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AgatATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
82	TVP-R9V	EPDEICRAVMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AgtcATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
83	TVP-R9M	EPDEICRAMMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AatgATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
84	TVP-R9I	EPDEICRAIMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AattATGACCAACAAAGAATTTACC TATAAGTCCAACGTATGCAATAA TTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCT

			GCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
85	TVP-R9Q/ T43A	EPDEICRAQMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYAACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AcaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACgcaGCTTGTCACGAG GCTCAGAAAGGT
86	TVP-R9Q	EPDEICRAQMTNK EFTYKSNVCNNCG DQVAACEAECFRN DVYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AcaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
87	TVP-R9C	EPDEICRACMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AtctATGACCAACAAAGAATTTACC TATAAGTCCAACGTATGCAATAA TTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCT GCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
88	TVP-R9E	EPDEICRAEMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AgaaATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
89	TVP-R9T	EPDEICRATMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AactATGACCAACAAAGAATTTAC CTATAAGTCCAACGTATGCAATA ATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCC

			TGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAA TGACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
90	TVP-R9S	EPDEICRASMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AtctATGACCAACAAAGAATTTACC TATAAGTCCAACGTATGCAATAA TTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCT GCGAGGCAGAGTGCTTTCGTAAT GACGTTTACACAGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
91	TVP-T43F	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYFACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACtttGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
92	TVP-T43P	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYPACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACcctGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
93	TVP-T43Y	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYYACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACtatGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
94	TVP-T43K	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYKACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC

			CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACaaaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
95	TVP-T43W	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYWACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACtggGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
96	TVP-T43H	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYHACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACcatGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
97	TVP-T43A	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYAACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgctGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
98	TVP-T43G	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYGACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACggtGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
99	TVP-T43N	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYNACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC

			CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACaatGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
100	TVP-T43L	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYLACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACttaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
101	TVP-T43D	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYDACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgatGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
102	TVP-T43V	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYVACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgtcGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
103	TVP-T43M	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYMACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACatgGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
104	TVP-T43I	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYIACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC

			CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACattGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
105	TVP-T43Q	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYQACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACcaaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
106	TVP-T43C	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYCACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACtctGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
107	TVP-T43E	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYEACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACgaaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
108	TVP-T43T	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYTACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACACAGCTTGTCACG AGGCTCAGAAAGGT
109	TVP-T43S	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYSACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC

			CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACtcaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT
110	TVP-T43R	EPDEICRARMTNKE FTYKSNVCNNCGD QVAACEAECFRND VYRACHEAQKG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGC AAGGATGACCAACAAAGAATTTA CCTATAAGTCCAACGTATGCAAT AATTGTGGCGACCAGGTGGCAGC CTGCGAGGCAGAGTGCTTTCGTA ATGACGTTTACagaGCTTGTCACGA GGCTCAGAAAGGT

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность может быть способна кодировать TVP, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, способна кодировать TVP. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, показанный в Таблице 2, способен кодировать TVP.

Таблица 2. Полинуклеотиды по настоящему изобретению.

Полинуклеотид SEQ ID NO	**Название**	**Последовательность**
16	WT-Ta1b	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAG CTTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
17	TVP-R9Q	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
18	TVP-R9QΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
19	TVP-K18A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC

		CAACAAAGAATTTACCTATgctTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
20	TVP-K18AΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATgctTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
21	TVP-R38A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTgctAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
22	TVP-R38AΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTgctAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
23	TVP-A8N	GAACCAGACGAGATATGCAGAaacAGGATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
24	TVP-A8NΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAaacAGGATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
25	TVP-A8S	GAACCAGACGAGATATGCAGAtcaAGGATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

26	TVP-A8SΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAtcaAGGATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
27	TVP-R9N	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAaacATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
28	TVP-R9NΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAaacATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
29	TVP-T11P	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGcct AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
30	TVP-T11PΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGcct AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA
54	TVP-T43A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgctGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
55	TVP-T43AΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgctGC TTGTCACGAGGCTCAGAAA

56	TVP-R9Q/T43A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgcaGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
57	TVP-R9Q/T43A/ΔG	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgctGCT TGTCACGAGGCTCAGAAA
58	TVP-R9Q/T43A/ΔK-G	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgctGCT TGTCACGAGGCTCAG
117	TVP-R9A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAgcaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
118	TVP-R9G	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAggaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
119	TVP-R9N	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAaatATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
120	TVP-R9L	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCActaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

121	TVP-R9D	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAgatATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
122	TVP-R9V	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAgtcATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
123	TVP-R9M	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAatgATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
124	TVP-R9I	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAattATGACCA ACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCA ATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGAG GCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
125	TVP-R9Q/ T43A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgcaGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
126	TVP-R9Q	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAcaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
127	TVP-R9C	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAtctATGACCA ACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCA ATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGAG GCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

128	TVP-R9E	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAgaaATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
129	TVP-R9T	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAactATGACC AACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGC AATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGA GGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
130	TVP-R9S	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAtctATGACCA ACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATGCA ATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCGAG GCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
131	TVP-T43F	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACtttGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
132	TVP-T43P	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACcctGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
133	TVP-T43Y	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACtatGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
134	TVP-T43K	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACaaaGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

135	TVP-T43W	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACtggGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
136	TVP-T43H	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACcatGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
137	TVP-T43A	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgctGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
138	TVP-T43G	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACggtGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
139	TVP-T43N	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACaatGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
140	TVP-T43L	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACttaGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
141	TVP-T43D	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgatGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

142	TVP-T43V	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgtcGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
143	TVP-T43M	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACatgGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
144	TVP-T43I	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACattGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
145	TVP-T43Q	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACcaaGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
146	TVP-T43C	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACtctGCT TGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
147	TVP-T43E	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACgaaGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
148	TVP-T43T	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACACAG CTTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

149	TVP-T43S	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACtcaGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT
150	TVP-T43R	GAACCAGACGAGATATGCAGAGCAAGGATGAC CAACAAAGAATTTACCTATAAGTCCAACGTATG CAATAATTGTGGCGACCAGGTGGCAGCCTGCG AGGCAGAGTGCTTTCGTAATGACGTTTACagaGC TTGTCACGAGGCTCAGAAAGGT

В некоторых вариантах осуществления TVP содержит одну или несколько мутаций относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, как указано в SEQ ID NO:1. Например, в некоторых вариантах осуществления TVP может иметь первую, вторую или третью мутацию относительно последовательности дикого типа U1-агатоксин-Ta1b, как указано в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь первую мутацию относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, как указано в SEQ ID NO:1, при этом первая мутация представляет собой аминокислотную замену R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P или T43A.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь первую и вторую мутацию относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, как указано в SEQ ID NO:1, например, R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG или T43AΔG; при этом первая мутация представляет собой аминокислотную замену R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N или T11P; и при этом вторая мутация представляет собой делецию С-концевого глицина.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь первую и вторую мутацию относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, как указано в SEQ ID NO:1, например, R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A или T11PT43A; при этом первая мутация представляет собой аминокислотную замену R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N или T11P; и при этом вторая мутация представляет собой аминокислотную замену T43A, которая приводит к тому, что TVP не является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь первую, вторую и третью мутацию относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, как указано в SEQ ID NO:1, например, R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG или T11PT43AΔG; при этом первая мутация представляет собой аминокислотную замену R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N или T11P; и при этом вторая мутация представляет собой аминокислотную замену T43A, которая приводит к

тому, что TVP не является гликозилированным; и при этом третья мутация представляет собой делецию С-концевого глицина.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления TVP может представлять собой TVP-R9Q/T43A (SEQ ID NO: 51).

В различных вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие TVP, можно использовать для трансформации клеток растений, дрожжевых клеток или клеток бактерий. В некоторых вариантах осуществления инсектицидные трансгенные белки TVP могут быть включены в состав композиций, которые можно распылять или иначе применять любым способом, известным специалистам в данной области техники, к поверхности растений или их частей. Соответственно, в настоящем документе предложены конструкции ДНК, способные кодировать один или несколько TVP в соответствующих условиях в клетке-хозяине, например, в клетке растения. Способы борьбы с заражением вредителями паразитическими насекомыми клетки растения включают введение или внесение полинуклеотида, кодирующего TVP, как описано в настоящем документе, в растение, ткань растения или клетку растения с помощью рекомбинантных методов, и выращивание указанного рекомбинантно измененного растения, ткани растения или клетки растения в поле, подвергшемся воздействию вредителя. В качестве альтернативы TVP могут быть включены в состав распыляемой композиции, состоящей из TVP и эксципиента, и применяться непосредственно к восприимчивым растениям путем прямого применения, так что поглощение TVP инфицирующим насекомым приводит к вредному воздействию.

В некоторых вариантах осуществления TVP может иметь аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 и 77-110. В некоторых вариантах осуществления TVP может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления TVP может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82%

идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления TVP может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности:
“EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYAACHEAQKG” (SEQ ID NO: 51).

В некоторых вариантах осуществления TVP может кодироваться полинуклеотидом. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом TVP содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K

или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарная ему нуклеотидная последовательность.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом полинуклеотидная последовательность имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарную ей нуклеотидную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может содержать полинуклеотид, при этом, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной

в SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать полинуклеотид, способный кодировать TVP.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать полинуклеотид, способный кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность с 90% сходством с последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

Примеры TVP

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична,

по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом

полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82%

идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при

этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82%

идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с

последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной, и при этом линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной

последовательности «EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYAACHEAQKG» (SEQ ID NO: 51).

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8%

идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемую соль; при этом если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемую соль, при этом X_1представляет собой Q; и Z_1 представляет собой A.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP) может представлять собой TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89%

идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51, или его фармацевтически приемлемую соль.

TVP-инсектицидные белки

TVP-инсектицидные белки представляют собой любой белок, пептид, полипептид, аминокислотную последовательность, конфигурацию или расположение, состоящие из: (1) по меньшей мере одного TVP или двух или более TVP; и (2) дополнительных нетоксичных пептидов, полипептидов или белков, которые, например, в некоторых вариантах осуществления обладают способностью выполнять следующее: повышать смертность и/или ингибировать рост насекомых, когда насекомые подвергаются воздействию TVP-инсектицидного белка, по сравнению только с TVP; повышать экспрессию указанного TVP-инсектицидного белка, например, в клетке-хозяине или системе экспрессии; и/или влиять на посттрансляционный процессинг TVP-инсектицидного белка. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может представлять собой полимер, содержащий два или более TVP. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может представлять собой полимер, содержащий два или более TVP, при этом TVP функционально связаны через линкерный пептид, например, расщепляемый и/или нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может относиться к одному или нескольким TVP, функционально связанным с одним или несколькими белками, такими как стабилизирующий домен (STA); сигнальный белок эндоплазматического ретикулума (СПЭР); расщепляемый насекомыми или нерасщепляемый насекомыми линкер (L) и/или любую другую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления TVP белок может представлять собой неприродный белок, содержащий (1) белок Ta1b дикого типа; и (2) дополнительные пептиды, полипептиды или белки, например, СПЭР; линкер; CTA; UBI или гистидинову метку, или аналогичный маркер.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать один или несколько TVP, представленных в Таблице 1, например, SEQ ID NO: 2-15, 49-53 и 77-110. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный белок может содержать гомополимер TVP, например, два или более мономера TVP, которые представляют собой один и тот же TVP. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный белок может содержать гетерополимер TVP, например, два или более мономера TVP, при этом мономеры TVP являются разными.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может

содержать гомополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой. Например, в некоторых вариантах осуществления TVP может иметь один полипептид, содержащий аминокислотную замену R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанный с другим полипептидом, содержащим один или несколько таких же TVP с одинаковыми аминокислотными заменами: т.е., аминокислотными заменами R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной. Например, в некоторых вариантах осуществления TVP может иметь один полипептид, содержащий аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1 в R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG; связанный с другим полипептидом, содержащим одну или несколько из следующих аминокислотных замен: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG; относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной. Например, в некоторых вариантах осуществления TVP может иметь один полипептид, содержащий аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1 в R9Q; связанный с другим полипептидом, содержащим одну или несколько из следующих аминокислотных замен: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A;

R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG; относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену R9QΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену K18A относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену K18AΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену R38A относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG;

K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену R38AΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену A8N относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену A8NΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену A8S относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; R9N; T11P; T43A; R9QΔG;

K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену A8SΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену R9N относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену R9NΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену T11P относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T43A; R9QΔG;

K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену T11PΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену T43A относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену T43AΔG относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену RQ9/T43A относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A;

R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислота каждого TVP является разной, например, один полипептид содержит аминокислотную замену RQ9/T43A относительно последовательности U1-атоксина-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, связанных с другим полипептидом, содержащим одну или несколько следующих аминокислотных замен относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; T11PT43A; R9QT43AΔG ; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG; T11PT43AΔG и/или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной. Например, в некоторых вариантах осуществления первый полимер TVP может иметь один полипептид, содержащий аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1 в R9Q; K18A; P38A; A8H; A8C; P9H; T11П; T43A; R9QΔG; K18AΔГ; P38AΔГ; A8NΔG; A8CΔГ; P9HΔГ; T11ПΔГ; T43AΔГ; R9QT43A; K18AT43A; P38AT43A; A8HT43A; A8CT43A; P9HT43A или T11ПT43A; R9QT43AΔG; K18AT43AΔГ; P38AT43AΔГ; A8HT43AΔГ; A8CT43AΔГ; P9HT43AΔГ и/или T11PT43AΔG, который является слитым со вторым полимером TVP, который может иметь аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1: R9Q; K18A; R38A; A8N; A8S; R9N; T11P; T43A; R9QΔG; K18AΔG; R38AΔG; A8NΔG; A8SΔG; R9NΔG; T11PΔG; T43AΔG; R9QT43A; K18AT43A; R38AT43A; A8NT43A; A8ST43A; R9NT43A; или T11PT43A R9QT43AΔG; K18AT43AΔG; R38AT43AΔG; A8NT43AΔG; A8ST43AΔG; R9NT43AΔG; и/или T11PT43AΔG.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидный белок может содержать слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной, при этом линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого. Примеры способов получения расщепляемых и нерасщепляемых линкеров можно найти в патентной заявке США № 15/727277 и заявке PCT № PCT/US2013/030042, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать один или несколько TVP, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-15, 49-53 и 77-110. В некоторых вариантах осуществления TVP может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать один или несколько TVP, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-15, 49-53 и 77-110. В некоторых вариантах осуществления TVP может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности “EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQVAACEAECFRNDVYAACHEAQKG” (SEQ ID NO: 51).

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ TVP

Способы получения белков хорошо известны в данной области техники, и существует множество доступных способов. Например, в некоторых вариантах осуществления белки могут быть получены с использованием рекомбинантных способов или химически синтезированы.

В некоторых вариантах осуществления TVP по настоящему изобретению можно создать с использованием любого известного способа получения белка. Например, в некоторых вариантах осуществления и без ограничения TVP можно создать с использованием рекомбинантной системы экспрессии, такой как дрожжевая система экспрессии или бактериальная система экспрессии. Однако специалисты в данной области

техники поймут, что доступны и другие способы получения белка.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения TVP с использованием рекомбинантной системы экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает, по сути состоит или состоит из способа получения TVP, причем указанный способ включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, содержащую, по сути состоящую из или состоящую из полинуклеотида, способного кодировать TVP, или комплементарной ему нуклеотидной последовательности, (b) введение вектора в клетку-хозяина, например, бактерию или дрожжи, или насекомое, или клетку растения, или клетку животного; и (c) выращивание штамма дрожжей в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP и секрецию в питательную среду. В некоторых связанных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку.

Изобретение применимо к широкому кругу клеток-хозяев (см. раздел о клетках-хозяевах ниже). Действительно, конечный пользователь изобретения может применять его принципы в любой клетке-хозяине по своему выбору. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может быть любой клеткой-хозяином, удовлетворяющей требованиям конечного пользователя; т. е. в некоторых вариантах осуществления экспрессия TVP может быть достигнута с использованием различных клеток-хозяев и в соответствии с положениями настоящего документа. Например, в некоторых вариантах осуществления пользователь может пожелать использовать один конкретный тип клетки-хозяина (например, дрожжевую клетку или бактериальную клетку) вместо другого; предпочтение данной клетки-хозяина может варьироваться в зависимости от доступности и стоимости.

Например, в некоторых вариантах осуществления, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает, по сути состоит из или состоит из способа получения TVP, причем указанный способ включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, содержащую, по сути состоящую из или состоящую из полинуклеотида, способного кодировать TVP, или комплементарной ему нуклеотидной последовательности; (b) введение вектора в клетку-хозяина, например, бактерию или дрожжи, или насекомое, или клетку растения, или клетку животного; и (c) выращивание штамма дрожжей в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP и секрецию в питательную среду. В некоторых связанных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку.

Выделение и мутирование U1-агатоксин-Ta1b дикого типа

TVP можно получить путем создания мутации в полинуклеотидной последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа; вставки этой полинуклеотидной последовательности варианта U1-агатоксин-Ta1b (tvp) в соответствующий вектор; трансформации организма-хозяина таким образом, чтобы экспрессировался полинуклеотид, кодирующий TVP; культивирования организма-хозяина для получения

желаемого количества TVP; и затем очистки TVP из организма-хозяина и/или вокруг него.

Получение мутации в полинуклеотидной последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа может быть достигнуто различными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Способы мутагенеза включают метод Кункеля; кассетный мутагенез; сайт-направленный мутагенез с ПЦР; технику «идеального уничтожения» (delitto perfetto); прямую делецию гена и сайт-специфический мутагенез с помощью ПЦР и одного рециклируемого маркера; прямую делецию гена и сайт-специфический мутагенез с помощью ПЦР и одного рециклируемого маркера с использованием длинных гомологичных участков; метод замещения «pop-in-pop-out» и CRISPR-Cas 9. Примеры методов сайт-направленного мутагенеза можно найти в Ruvkun & Ausubel, A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature. 1981 Jan 1; 289(5793):85-8; Wallace et al., Oligonucleotide directed mutagenesis of the human beta-globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. Nucleic Acids Res. 1981 Aug 11; 9(15):3647-56; Dalbadie-McFarland et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Nov; 79(21):6409-13; Bachman. Site-directed mutagenesis. Methods Enzymol. 2013; 529:241-8; Carey et al., PCR-mediated site-directed mutagenesis. Cold Spring Harb Protoc. 2013 Aug 1; 2013(8):738-42 и Cong et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15; 339(6121):819-23, содержание всех вышеупомянутых ссылок включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме.

Токсины U1-агатоксин-Ta1b дикого типа могут быть выделены из яда пауков. Яд паука можно выделить из ядовитых желез пауков (например, пауков, таких как Eratigena agrestis), используя любой из методов, известных специалистам в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления яд может быть выделен из пауков в соответствии со способами, описанными в патенте США № 5688764, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Полинуклеотидная последовательность U1-агатоксин-Ta1b дикого типа может быть получена путем скрининга геномной библиотеки с использованием зондов-праймеров, направленных на полинуклеотидную последовательность U1-агатоксин-Ta1b. Альтернативно, полинуклеотидная последовательность U1-агатоксин-Ta1b дикого типа и/или полинуклеотидная последовательность TVP могут быть синтезированы химическим путем. Например, полинуклеотидная последовательность U1-агатоксин-Ta1b дикого типа и/или полинуклеотидная последовательность TVP могут быть получены с использованием методов синтеза олигонуклеотидов, таких как фосфорамидит; методы с триэфиром, фосфитом или H-фосфонатом (см. Engels, J.W. and Uhlmann, E. (1989), Gene Synthesis [New Synthetic Methods (77)]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Химический синтез полинуклеотидов TVP

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность,

кодирующая TVP, может быть химически синтезирована с использованием коммерчески доступных услуг синтеза полинуклеотидов, таких как услуги, предлагаемые GENEWIZ® (например, TurboGENE™, PriorityGENE и FragmentGENE) или SIGMA-ALDRICH® (например, индивидуальный дизайн олигонуклеотидов ДНК и РНК и индивидуальные олигонуклеотиды ДНК на заказ). Примерный способ получения ДНК и/или индивидуально синтезированных химическим путем полинуклеотидов хорошо известен в данной области техники и иллюстративно представлен в патенте США № 5736135, номер заявки № 08/389615, поданной 13 февраля 1995 г., содержание которого включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме. *См. также* Agarwal, et al., Chemical synthesis of polynucleotides. Angew Chem Int Ed Engl. 1972 Jun; 11(6):451-9; Ohtsuka et al., Recent developments in the chemical synthesis of polynucleotides. Nucleic Acids Res. 1982 Nov 11; 10(21): 6553-6570; Sondek & Shortle. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 15; 89(8): 3581-3585; Beaucage S. L., et al., Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. Tetrahedron, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, vol. 48, No. 12, 1992, pp. 2223-2311; Agrawal (1993) Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties; Methods in Molecular Biology Vol. 20, содержание которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Химический синтез полинуклеотидов позволяет создать последовательность ДНК, адаптированную для получения желаемого полипептида на основе расположения нуклеотидов в указанной последовательности (т.е. расположения цитозина [C], гуанина [G], аденина [A] или тимина [T] молекулы); последовательность мРНК, которая транскрибируется с химически синтезированного полинуклеотида ДНК, может быть транслирована в аминокислотную последовательность, причем каждая аминокислота соответствует кодону в последовательности мРНК. Соответственно, аминокислотный состав полипептидной цепи, которая транслируется с последовательности мРНК, может быть изменен путем изменения лежащего в основе кодона, который определяет, какая из 20 аминокислот будет добавлена к растущему полипептиду; таким образом, мутации в ДНК, такие как вставки, замены, делеции и сдвиги рамки считывания, могут вызывать вставки, замены или делеции аминокислот, в зависимости от лежащего в основе кодона.

Получение TVP из химически синтезированной полинуклеотидной последовательности ДНК и/или полинуклеотидной последовательности ДНК дикого типа, которая была изменена посредством мутагенеза, может быть достигнуто путем клонирования последовательности ДНК в соответствующий вектор. Специалистам в данной области известно множество доступных векторов экспрессии, организмов-хозяев и стратегий клонирования. Например, вектор может представлять собой плазмиду, которая может вводить гетерологичный ген и/или кассету экспрессии в дрожжевые клетки для транскрипции и трансляции. Термин «вектор» используется для обозначения молекулы-носителя нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена последовательность

нуклеиновой кислоты для введения в клетку, где она может реплицироваться. Вектор может содержать «векторные элементы», такие как точка начала репликации (ORI); ген, придающий устойчивость к антибиотикам для обеспечения селекции; несколько сайтов клонирования; промоторная область; маркер селекции для небактериальной трансфекции; и сайт связывания праймера. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть «экзогенной», что означает, что она является чужеродной для клетки, в которую вводится вектор, или что последовательность гомологична последовательности в клетке, но находится в положении внутри нуклеиновой кислоты клетки-хозяина, в котором последовательность обычно не обнаруживается. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC). Специалист в данной области техники может сконструировать вектор с помощью стандартных рекомбинантных методов, описанных в Sambrook et al., 1989 и Ausubel et al., 1996, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В дополнение к кодированию варианта полинуклеотида Ta1b вектор может кодировать молекулу-мишень. Молекула-мишень - это молекула, которая направляет желаемую нуклеиновую кислоту в конкретную ткань, клетку или другое место.

Векторы и трансформация

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид TVP можно клонировать в вектор с использованием различных стратегий клонирования и коммерческих наборов для клонирования и материалов, легко доступных специалистам в данной области техники. Например, полинуклеотид TVP можно клонировать в вектор с использованием таких стратегий, как SnapFast; Gateway; TOPO; Gibson; LIC; InFusionHD или Electra. Существует множество коммерчески доступных векторов, которые можно использовать для получения TVP. Например, полинуклеотид TVP можно получить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и объединить с вектором pCR™II-TOPO или вектором PCR™2.1-TOPO® (коммерчески доступным как набор TOPO® TA Cloning® Kit от Invitrogen) в течение 5 минут при комнатной температуре; реакция TOPO® затем может быть преобразована в компетентные клетки, которые затем могут быть отобраны на основе изменения цвета (см. Janke et al., A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. Yeast. 2004 Aug; 21(11):947-62; см. также, Adams et al. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor, NY, 1997, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть клонирован в вектор, такой как плазмида, космида, вирус (бактериофаг, вирусы животных и вирусы растений) и/или искусственная хромосома (например, YAC).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть встроен в вектор, например, в плазмидный вектор с использованием E. coli в качестве хозяина, путем выполнения следующих действий: расщепления примерно 2-5

мкг векторной ДНК с использованием рестрикционных ферментов, необходимых для вставки интересующего сегмента ДНК, с последующей инкубацией в течение ночи для завершения расщепления (для дефосфорилирования 5'-конца можно использовать щелочную фосфатазу, чтобы избежать самолигирование/рециркуляция); гелевой очистки расщепленого вектора. Затем амплифицируют интересующий сегмент ДНК, например, полинуклеотид, кодирующий TVP, с помощью ПЦР и удаляют любые избыточные ферменты, праймеры, невключенные дНТФ, короткие побочные продукты ПЦР и/или соли из реакции ПЦР, используя методы, известные специалисты в данной области техники (например, с помощью набора для отмывки ПЦР). Лигируют представляющий интерес сегмент ДНК с вектором, создавая смесь, включающую: около 20 нг вектора; около 100-1000 нг представляющего интерес сегмента ДНК; 2 мкл 10-кратного буфера (т.е. 30 мМ трис-HCl, 4 мМ $MgCl_2$, 26 мкМ НАД, 1 мМ ДТТ, 50 мкг/мл БСА, pH 8, хранят при 25°C); 1 мкл ДНК-лигазы T4; все доводили до общего объема 20 мкл добавлением H_2O. Затем реакционную смесь лигирования можно инкубировать при комнатной температуре в течение 2 часов или при 16°C в течение ночи. Реакцию лигирования (т.е. около 1 мкл) затем можно трансформировать в компетентные клетки, например, с помощью электропорации или химических методов, после чего можно провести ПЦР колоний для идентификации векторов, содержащих представляющий интерес сегмент ДНК.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, вместе с другими сегментами ДНК, составляющими вместе ОРС экспрессии TVP, может быть сконструирован для секреции дрожжевыми клетками-хозяевами. Иллюстративный способ конструирования ОРС экспрессии TVP заключается в следующем: ОРС может начинаться с последовательности сигнального пептида, за которой следует последовательность ДНК, кодирующая сайт расщепления Kex2 (лизин-аргинин), а затем трансген полинуклеотида TVP с добавление глицин-сериновых кодонов на 5'-конце и, наконец, стоп-кодон на 3'-конце. Все эти элементы затем будут экспрессироваться в слитый пептид в дрожжевых клетках в виде единой открытой рамки считывания (ОРС). Сигнальная последовательность α-фактора спаривания (αMF; англ.: α-mating factor) наиболее часто используется для облегчения метаболического процессинга рекомбинантных инсектицидных пептидов через эндогенный путь секреции рекомбинантных дрожжей, т.е. экспрессированный слитый пептид обычно поступает в эндоплазматический ретикулум, при этом сигнальная последовательность α-фактора спаривания удаляется под действием сигнальной пептидазы, а затем полученный проинсектицидный пептид направляется в аппарат Гольджи, в котором упомянутый выше дипептид лизин-аргинин полностью удаляется эндопротеазой Kex2, после чего зрелый полипептид (т.е. TVP) секретируется из клеток.

В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии полипептидов в рекомбинантных дрожжевых клетках можно повысить путем оптимизации кодонов на основе конкретных видов дрожжей-хозяев. Встречающиеся в природе частоты кодонов,

наблюдаемые в эндогенных открытых рамках считывания данного организма-хозяина, не обязательно должны быть оптимизированы для высокоэффективной экспрессии. Кроме того, разные виды дрожжей (например, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae и т. д.) имеют разные оптимальные кодоны для высокой эффективности экспрессии. Следовательно, следует рассмотреть оптимизацию кодонов для ОРС экспрессии TVP, включая элементы последовательности, кодирующие сигнальную последовательность, сайт расщепления Kex2 и TVP, поскольку они первоначально транслируются как один слитый пептид в рекомбинантных дрожжевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления оптимизированная по кодонам ОРС экспрессии TVP может быть лигирована в дрожжевые векторы экспрессии для экспрессии дрожжами. Существует множество векторов экспрессии, доступных для экспрессии дрожжами, включая эписомальные векторы и интегративные векторы, и они обычно разрабатываются для определенных штаммов дрожжей. Следует тщательно выбирать подходящий вектор экспрессии с учетом конкретной системы экспрессии дрожжей, которая будет использоваться для продукции пептида. В некоторых вариантах осуществления можно использовать интегративные векторы, которые интегрируются в хромосомы трансформированных дрожжевых клеток и остаются стабильными в течение циклов клеточного деления и пролиферации. Интегративные последовательности ДНК гомологичны целевым локусам геномной ДНК в трансформированных видах дрожжей, и такие интегративные последовательности включают pLAC4, 25S рДНК, pAOX1 и TRP2 и т. д. Расположение трансгенов инсектицидных пептидов может быть смежным с интегративной последовательностью ДНК (инсерционные векторы) или в пределах интегративной последовательности ДНК (замещающие векторы).

В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии могут содержать элементы E. coli для получения ДНК в E. coli, например, точку начала репликации E. coli, селективный маркер для антибиотика и т. д. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать набор элементов последовательности, необходимых для экспрессии представляющего интерес трансгена, например, промоторы транскрипции, терминаторы, селективный маркеры дрожжей, интегративные последовательности ДНК, гомологичные ДНК дрожжей-хозяев, и т. д. Доступно множество подходящих промоторов дрожжей, включая природные и сконструированные промоторы, например, промоторы дрожжей, такие как pLAC4, pAOX1, pUPP, pADH1, pTEF, pGal1 и т. д., и другие, которые можно использовать в некоторых вариантах осуществления.

В некоторых вариантах осуществления способы селекции, такие как ацетамидная прототрофная селекция; селекция в отношении устойчивости к зеоцину; селекция в отношении устойчивости к генетицин; селекция в отношении устойчивости к ноурсеотрикину; селекция в отношении дефицита урацила и/или могут быть использованы другие методы селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления в качестве селективного маркера можно использовать ген amdS Aspergillus nidulans. Примеры способов использования селективных маркеров можно найти в патентах США

№ 6548285 (подан 3 апреля 1997 г.); № 6165715 (подан 22 июня 1998 г.); и № 6110707 (подан 17 января 1997 г.), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть встроен в плазмиду pKLAC1. pKLAC1 коммерчески доступна от New England Biolabs® Inc. (артикул № (NEB #E1000). pKLAC1 предназначен для достижения высокого уровня экспрессии рекомбинантного белка (например, TVP) в дрожжах Kluyveromyces lactis. Плазмиду pKLAC1 можно заказать отдельно или в составе набора для экспрессии белка K. lactis. Плазмида pKLAC1 может быть линеаризована с использованием ферментов рестрикции SacII или BstXI и обладает MCS ниже сигнала секреции αMF. Сигнал секреции αMF направляет рекомбинантные белки по секреторному пути, которые затем расщепляются с помощью Kex2, в результате чего образуется представляющие интерес пептид, например, TVP. Kex2 представляет собой кальций-зависимую сериновую протеазу, которая участвует в активации пропротеинов секреторного пути и является коммерчески доступной (PeproTech®; артикул № 450-45).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть вставлен в плазмиду pKlac1 или субклонирован в плазмиду pKlac1 после отбора колоний дрожжей, трансформированных плазмидами pKLAC1, лигированными с полинуклеотидом, кодирующим TVP. Дрожжи, например K. lactis, трансформированные плазмидами pKLAC1, лигированными полинуклеотидом, кодирующим TVP, могут быть отобраны на основе ацетамидазы (amdS), которая позволяет трансформированным дрожжевым клеткам расти в среде YCB, содержащей ацетамид в качестве единственного источника азота. Так идентифицируют положительные колонии дрожжей, трансформированные плазмидами pKLAC1, лигированными полинуклеотидом, кодирующим TVP.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть встроен в другие коммерчески доступные плазмиды и/или векторы, которые легко доступны специалистам в данной области техники, например, плазмиды доступны от Addgene (некоммерческий репозиторий плазмид); GenScript®; Takara®; Qiagen® и Promega™.

В некоторых вариантах осуществления дрожжевая клетка, трансформированная одной или несколькими кассетами экспресси TVP, может продуцировать TVP в культуре дрожжей с выходом: по меньшей мере 70 мг/л, по меньшей мере 80 мг/л, по меньшей мере 90 мг/л, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 110 мг/л, по меньшей мере 120 мг/л, по меньшей мере 130 мг/л, по меньшей мере 140 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 160 мг/л, по меньшей мере 170 мг/л, по меньшей мере 180 мг/л, по меньшей мере 190, по меньшей мере мг/л 200 мг/л, по меньшей мере 500 мг/л, по меньшей мере 750 мг/л, по меньшей мере 1000 мг/л, по меньшей мере 1250 мг/л, по меньшей мере 1500 мг/л, по меньшей мере 1750 мг/л, по меньшей мере 2000 мг/л, по меньшей мере 2500 мг/л, по меньшей мере 3000 мг/л, по меньшей мере 3500 мг/л, по меньшей мере 4000 мг/л, по

меньшей мере 4500 мг/л, по меньшей мере 5000 мг/л, по меньшей мере 5500 мг/л, по меньшей мере по меньшей мере 6000 мг/л, по меньшей мере 6500 мг/л, по меньшей мере 7000 мг/л, по меньшей мере 7500 мг/л, по меньшей мере 8000 мг/л, по меньшей мере 8500 мг/л, по меньшей мере 9000 мг/л, по меньшей мере 9500 мг/л, по меньшей мере 10000 мг/л, по меньшей мере 11000 мг/л, по меньшей мере 12000 мг/л, по меньшей мере 12500 мг/л, по меньшей мере 13000 мг/л, по меньшей мере 14000 мг/л, по меньшей мере 15000 мг/л, по меньшей мере 16000 мг/л, по меньшей мере 17000 мг/л, по меньшей мере 17500 мг/л, по меньшей мере 18000 мг/л, по меньшей мере 19000 мг/л, по меньшей мере 20000 мг/л, по меньшей мере 25000 мг/л, по меньшей мере 30000 мг/л, по меньшей мере 40000 мг/л, по меньшей мере 50000 мг/л, по меньшей мере 60000 мг/л, по меньшей мере 70000 мг/л, по меньшей мере 80000 мг/л, по меньшей мере 90000 мг/л или по меньшей мере 100000 мг/л TVP на литр среды.

В некоторых вариантах осуществления в вектор можно встроить одну или несколько кассет экспрессии, содержащих полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, что приводит к выходу TVP в диапазоне от около 100 мг/л до около 100000 мг/л; от около 110 мг/л до около 100000 мг/л; от около 120 мг/л до около 100000 мг/л; от около 130 мг/л до около 100000 мг/л; от около 140 мг/л до около 100000 мг/л; от около 150 мг/л до около 100000 мг/л; от около 160 мг/л до около 100000 мг/л; от около 170 мг/л до около 100000 мг/л; от около 180 мг/л до около 100000 мг/л; от около 190 мг/л до около 100000 мг/л; от около 200 мг/л до около 100000 мг/л; от около 250 мг/л до около 100000 мг/л; от около 500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 750 мг/л до около 100000 мг/л; от около 1000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 1000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 1500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 2000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 2500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 3000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 3500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 4000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 4500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 5000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 5500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 6000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 6500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 7000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 7500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 8000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 8500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 9000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 9500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 10000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 10500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 11000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 11500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 12000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 12500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 13000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 13500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 14000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 14500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 15000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 15500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 16000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 16500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 17000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 17500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 18000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 18500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 19000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 19500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 20000 мг/л до около

100000 мг/л; от около 20500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 21000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 21500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 22000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 22500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 23000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 23500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 24000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 24500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 25000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 25500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 26000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 26500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 27000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 27500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 28000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 28500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 29000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 29500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 30000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 30500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 31000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 31500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 32000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 32500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 33000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 33500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 34000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 34500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 35000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 35500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 36000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 36500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 37000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 37500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 38000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 38500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 39000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 39500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 40000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 40500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 41000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 41500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 42000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 42500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 43000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 43500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 44000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 44500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 45000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 45500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 46000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 46500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 47000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 47500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 48000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 48500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 49000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 49500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 50000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 50500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 51000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 51500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 52000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 52500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 53000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 53500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 54000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 54500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 55000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 55500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 56000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 56500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 57000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 57500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 58000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 58500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 59000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 59500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 60000 мг/л до около

100000 мг/л; от около 60500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 61000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 61500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 62000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 62500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 63000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 63500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 64000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 64500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 65000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 65500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 66000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 66500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 67000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 67500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 68000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 68500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 69000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 69500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 70000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 70500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 71000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 71500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 72000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 72500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 73000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 73500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 74000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 74500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 75000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 75500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 76000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 76500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 77000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 77500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 78000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 78500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 79000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 79500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 80000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 80500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 81000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 81500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 82000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 82500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 83000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 83500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 84000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 84500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 85000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 85500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 86000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 86500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 87000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 87500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 88000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 88500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 89000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 89500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 90000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 90500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 91000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 91500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 92000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 92500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 93000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 93500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 94000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 94500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 95000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 95500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 96000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 96500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 97000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 97500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 98000 мг/л до около 100000 мг/л; от около 98500 мг/л до около 100000 мг/л; от около 99000 мг/л до около 100000 мг/л или от около 99500 мг/л до около 100000 мг/л TVP на литр среды

(супернатант дрожжевого ферментационного бульона).

В некоторых вариантах осуществления в вектор можно встроить одну или несколько кассет экспрессии, содержащих полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, что приводит к выходу TVP в диапазоне от около 100 мг/л до около 100000 мг/л; от около 100 мг/л до около 99500 мг/л; от около 100 мг/л до около 99000 мг/л; от около 100 мг/л до около 98500 мг/л; от около 100 мг/л до около 98000 мг/л; от около 100 мг/л до около 97500 мг/л; от около 100 мг/л до около 97000 мг/л; от около 100 мг/л до около 96500 мг/л; от около 100 мг/л до около 96000 мг/л; от около 100 мг/л до около 95500 мг/л; от около 100 мг/л до около 95000 мг/л; от около 100 мг/л до около 94500 мг/л; от около 100 мг/л до около 94000 мг/л; от около 100 мг/л до около 93500 мг/л; от около 100 мг/л до около 93000 мг/л; от около 100 мг/л до около 92500 мг/л; от около 100 мг/л до около 92000 мг/л; от около 100 мг/л до около 91500 мг/л; от около 100 мг/л до около 91000 мг/л; от около 100 мг/л до около 90500 мг/л; от около 100 мг/л до около 90000 мг/л; от около 100 мг/л до около 89500 мг/л; от около 100 мг/л до около 89000 мг/л; от около 100 мг/л до около 88500 мг/л; от около 100 мг/л до около 88000 мг/л; от около 100 мг/л до около 87500 мг/л; от около 100 мг/л до около 87000 мг/л; от около 100 мг/л до около 86500 мг/л; от около 100 мг/л до около 86000 мг/л; от около 100 мг/л до около 85500 мг/л; от около 100 мг/л до около 85000 мг/л; от около 100 мг/л до около 84500 мг/л; от около 100 мг/л до около 84000 мг/л; от около 100 мг/л до около 83500 мг/л; от около 100 мг/л до около 83000 мг/л; от около 100 мг/л до около 82500 мг/л; от около 100 мг/л до около 82000 мг/л; от около 100 мг/л до около 81500 мг/л; от около 100 мг/л до около 81000 мг/л; от около 100 мг/л до около 80500 мг/л; от около 100 мг/л до около 80000 мг/л; от около 100 мг/л до около 79500 мг/л; от около 100 мг/л до около 79000 мг/л; от около 100 мг/л до около 78500 мг/л; от около 100 мг/л до около 78000 мг/л; от около 100 мг/л до около 77500 мг/л; от около 100 мг/л до около 77000 мг/л; от около 100 мг/л до около 76500 мг/л; от около 100 мг/л до около 76000 мг/л; от около 100 мг/л до около 75500 мг/л; от около 100 мг/л до около 75000 мг/л; от около 100 мг/л до около 74500 мг/л; от около 100 мг/л до около 74000 мг/л; от около 100 мг/л до около 73500 мг/л; от около 100 мг/л до около 73000 мг/л; от около 100 мг/л до около 72500 мг/л; от около 100 мг/л до около 72000 мг/л; от около 100 мг/л до около 71500 мг/л; от около 100 мг/л до около 71000 мг/л; от около 100 мг/л до около 70500 мг/л; от около 100 мг/л до около 70000 мг/л; от около 100 мг/л до около 69500 мг/л; от около 100 мг/л до около 69000 мг/л; от около 100 мг/л до около 68500 мг/л; от около 100 мг/л до около 68000 мг/л; от около 100 мг/л до около 67500 мг/л; от около 100 мг/л до около 67000 мг/л; от около 100 мг/л до около 66500 мг/л; от около 100 мг/л до около 66000 мг/л; от около 100 мг/л до около 65500 мг/л; от около 100 мг/л до около 65000 мг/л; от около 100 мг/л до около 64500 мг/л; от около 100 мг/л до около 64000 мг/л; от около 100 мг/л до около 63500 мг/л; от около 100 мг/л до около 63000 мг/л; от около 100 мг/л до около 62500 мг/л; от около 100 мг/л до около 62000 мг/л; от около 100 мг/л до около 61500 мг/л; от около 100 мг/л до около 61000 мг/л; от около 100 мг/л до около 60500 мг/л; от около 100 мг/л до около 60000 мг/л; от около 100 мг/л до около 59500 мг/л; от

около 100 мг/л до около 59000 мг/л; от около 100 мг/л до около 58500 мг/л; от около 100 мг/л до около 58000 мг/л; от около 100 мг/л до около 57500 мг/л; от около 100 мг/л до около 57000 мг/л; от около 100 мг/л до около 56500 мг/л; от около 100 мг/л до около 56000 мг/л; от около 100 мг/л до около 55500 мг/л; от около 100 мг/л до около 55000 мг/л; от около 100 мг/л до около 54500 мг/л; от около 100 мг/л до около 54000 мг/л; от около 100 мг/л до около 53500 мг/л; от около 100 мг/л до около 53000 мг/л; от около 100 мг/л до около 52500 мг/л; от около 100 мг/л до около 52000 мг/л; от около 100 мг/л до около 51500 мг/л; от около 100 мг/л до около 51000 мг/л; от около 100 мг/л до около 50500 мг/л; от около 100 мг/л до около 50000 мг/л; от около 100 мг/л до около 49500 мг/л; от около 100 мг/л до около 49000 мг/л; от около 100 мг/л до около 48500 мг/л; от около 100 мг/л до около 48000 мг/л; от около 100 мг/л до около 47500 мг/л; от около 100 мг/л до около 47000 мг/л; от около 100 мг/л до около 46500 мг/л; от около 100 мг/л до около 46000 мг/л; от около 100 мг/л до около 45500 мг/л; от около 100 мг/л до около 45000 мг/л; от около 100 мг/л до около 44500 мг/л; от около 100 мг/л до около 44000 мг/л; от около 100 мг/л до около 43500 мг/л; от около 100 мг/л до около 43000 мг/л; от около 100 мг/л до около 42500 мг/л; от около 100 мг/л до около 42000 мг/л; от около 100 мг/л до около 41500 мг/л; от около 100 мг/л до около 41000 мг/л; от около 100 мг/л до около 40500 мг/л; от около 100 мг/л до около 40000 мг/л; от около 100 мг/л до около 39500 мг/л; от около 100 мг/л до около 39000 мг/л; от около 100 мг/л до около 38500 мг/л; от около 100 мг/л до около 38000 мг/л; от около 100 мг/л до около 37500 мг/л; от около 100 мг/л до около 37000 мг/л; от около 100 мг/л до около 36500 мг/л; от около 100 мг/л до около 36000 мг/л; от около 100 мг/л до около 35500 мг/л; от около 100 мг/л до около 35000 мг/л; от около 100 мг/л до около 34500 мг/л; от около 100 мг/л до около 34000 мг/л; от около 100 мг/л до около 33500 мг/л; от около 100 мг/л до около 33000 мг/л; от около 100 мг/л до около 32500 мг/л; от около 100 мг/л до около 32000 мг/л; от около 100 мг/л до около 31500 мг/л; от около 100 мг/л до около 31000 мг/л; от около 100 мг/л до около 30500 мг/л; от около 100 мг/л до около 30000 мг/л; от около 100 мг/л до около 29500 мг/л; от около 100 мг/л до около 29000 мг/л; от около 100 мг/л до около 28500 мг/л; от около 100 мг/л до около 28000 мг/л; от около 100 мг/л до около 27500 мг/л; от около 100 мг/л до около 27000 мг/л; от около 100 мг/л до около 26500 мг/л; от около 100 мг/л до около 26000 мг/л; от около 100 мг/л до около 25500 мг/л; от около 100 мг/л до около 25000 мг/л; от около 100 мг/л до около 24500 мг/л; от около 100 мг/л до около 24000 мг/л; от около 100 мг/л до около 23500 мг/л; от около 100 мг/л до около 23000 мг/л; от около 100 мг/л до около 22500 мг/л; от около 100 мг/л до около 22000 мг/л; от около 100 мг/л до около 21500 мг/л; от около 100 мг/л до около 21000 мг/л; от около 100 мг/л до около 20500 мг/л; от около 100 мг/л до около 20000 мг/л; от около 100 мг/л до около 19500 мг/л; от около 100 мг/л до около 19000 мг/л; от около 100 мг/л до около 18500 мг/л; от около 100 мг/л до около 18000 мг/л; от около 100 мг/л до около 17500 мг/л; от около 100 мг/л до около 17000 мг/л; от около 100 мг/л до около 16500 мг/л; от около 100 мг/л до около 16000 мг/л; от около 100 мг/л до около 15500 мг/л; от около 100 мг/л до около 15000 мг/л; от около 100 мг/л до около 14500 мг/л; от

около 100 мг/л до около 14000 мг/л; от около 100 мг/л до около 13500 мг/л; от около 100 мг/л до около 13000 мг/л; от около 100 мг/л до около 12500 мг/л; от около 100 мг/л до около 12000 мг/л; от около 100 мг/л до около 11500 мг/л; от около 100 мг/л до около 11000 мг/л; от около 100 мг/л до около 10500 мг/л; от около 100 мг/л до около 10000 мг/л; от около 100 мг/л до около 9500 мг/л; от около 100 мг/л до около 9000 мг/л; от около 100 мг/л до около 8500 мг/л; от около 100 мг/л до около 8000 мг/л; от около 100 мг/л до около 7500 мг/л; от около 100 мг/л до около 7000 мг/л; от около 100 мг/л до около 6500 мг/л; от около 100 мг/л до около 6000 мг/л; от около 100 мг/л до около 5500 мг/л; от около 100 мг/л до около 5000 мг/л; от около 100 мг/л до около 4500 мг/л; от около 100 мг/л до около 4000 мг/л; от около 100 мг/л до около 3500 мг/л; от около 100 мг/л до около 3000 мг/л; от около 100 мг/л до около 2500 мг/л; от около 100 мг/л до около 2000 мг/л; от около 100 мг/л до около 1500 мг/л; от около 100 мг/л до около 1000 мг/л; от около 100 мг/л до около 1000 мг/л; от около 100 мг/л до около 750 мг/л; от около 100 мг/л до около 500 мг/л; от около 100 мг/л до около 250 мг/л; от около 100 мг/л до около 100 мг/л или от около 100 мг/л до около 110 мг/л TVP на литр среды (супернатант дрожжевого ферментационного бульона).

В дополнение к полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей TVP, в вектор можно клонировать дополнительные сегменты ДНК, известные как регуляторные элементы, которые обеспечивают усиленную экспрессию чужеродной ДНК или трансгена; примеры таких дополнительных сегментов ДНК включают (1) промоторы, терминаторы и/или энхансерные элементы; (2) соответствующий мРНК-стабилизирующий сигнал полиаденилирования; (3) внутренний сайт посадки рибосомы (IRES); (4) интроны и (5) посттранскрипционные регуляторные элементы. Комбинация интересующего сегмента ДНК (например, tvp) с любым из вышеупомянутых цис-действующих элементов называется «кассетой экспрессии».

Одна кассета экспрессии может содержать один или несколько вышеупомянутых регуляторных элементов и полинуклеотид, способный экспрессировать TVP. Например, в некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии TVP может содержать полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, и сигнал α-MF; сайт Kex2; терминатор LAC4; промотор ADN1 и маркер селекции ацетамидазы (amdS), фланкированный промоторами LAC4 на 5'-конце и 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления в вектор может быть клонировано множество кассет экспрессии. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть первая кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид, способный экспрессировать TVP. В альтернативных вариантах осуществления имеются две кассеты экспрессии, способные кодировать TVP (т.е. двойная кассета экспрессии). В других вариантах осуществления имеются три кассеты экспрессии, способные кодировать TVP (т.е. тройная кассета экспрессии).

В некоторых вариантах осуществления двойная кассета экспрессии может быть получена путем субклонирования второй кассеты экспрессии TVP в вектор, содержащий первую кассету экспрессии TVP.

В некоторых вариантах осуществления тройная кассета экспрессии может быть получена путем субклонирования третьей кассеты экспрессии TVP в вектор, содержащий первую и вторую кассеты экспрессии TVP.

В некоторых вариантах осуществления дрожжевая клетка, трансформированная одной или несколькими кассетами экспресси TVP, может продуцировать TVP в культуре дрожжей с выходом: по меньшей мере 70 мг/л, по меньшей мере 80 мг/л, по меньшей мере 90 мг/л, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 110 мг/л, по меньшей мере 120 мг/л, по меньшей мере 130 мг/л, по меньшей мере 140 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 160 мг/л, по меньшей мере 170 мг/л, по меньшей мере 180 мг/л, по меньшей мере 190, по меньшей мере мг/л 200 мг/л, по меньшей мере 500 мг/л, по меньшей мере 750 мг/л, по меньшей мере 1000 мг/л, по меньшей мере 1250 мг/л, по меньшей мере 1500 мг/л, по меньшей мере 1750 мг/л, по меньшей мере 2000 мг/л, по меньшей мере 2500 мг/л, по меньшей мере 3000 мг/л, по меньшей мере 3500 мг/л, по меньшей мере 4000 мг/л, по меньшей мере 4500 мг/л, по меньшей мере 5000 мг/л, по меньшей мере 5500 мг/л, по меньшей мере по меньшей мере 6000 мг/л, по меньшей мере 6500 мг/л, по меньшей мере 7000 мг/л, по меньшей мере 7500 мг/л, по меньшей мере 8000 мг/л, по меньшей мере 8500 мг/л, по меньшей мере 9000 мг/л, по меньшей мере 9500 мг/л, по меньшей мере 10000 мг/л, по меньшей мере 11000 мг/л, по меньшей мере 12000 мг/л, по меньшей мере 12500 мг/л, по меньшей мере 13000 мг/л, по меньшей мере 14000 мг/л, по меньшей мере 15000 мг/л, по меньшей мере 16000 мг/л, по меньшей мере 17000 мг/л, по меньшей мере 17500 мг/л, по меньшей мере 18000 мг/л, по меньшей мере 19000 мг/л, по меньшей мере 20000 мг/л, по меньшей мере 25000 мг/л, по меньшей мере 30000 мг/л, по меньшей мере 40000 мг/л, по меньшей мере 50000 мг/л, по меньшей мере 60000 мг/л, по меньшей мере 70000 мг/л, по меньшей мере 80000 мг/л, по меньшей мере 90000 мг/л или по меньшей мере 100000 мг/л TVP на литр среды для культивирования дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления одну или несколько кассет экспрессии, содержащих полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, можно вставить в вектор, например, в плазмиду pKlac1, что приводит к выходу около 100 мг/л TVP (супернатант дрожжевого ферментационного бульона). Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать две кассеты экспрессии, содержащие полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, можно вставить в вектор, например, в плазмиду pKS482, что приводит к выходу около 2 г/л TVP (супернатант дрожжевого ферментационного бульона). Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления три кассеты экспрессии, содержащие полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, можно вставить в вектор, например, в плазмиду pKlac1T.

В некоторых вариантах осуществления несколько кассет экспрессии TVP могут быть трансфицированы в дрожжи, чтобы обеспечить интеграцию одной или нескольких копий оптимизированного трансгена TVP в геном K. Lactis.. Примерный способ введения множественных кассет экспрессии TVP в геном K. lactis представляет собой следующее: синтезируют последовательность ДНК кассеты экспрессии TVP, содержащую интактный

промоторный элемент LAC4, кодон-оптимизированный элемент ОРС экспрессии TVP и терминаторный элемент pLAC4; интактную кассету экспресси лигируют в вектор pKlac1 между сайтами рестрикции Sal I и Kpn I ниже терминатора pLAC4 pKS477, в результате чего получают двойной трансгенный вектор экспрессии TVP, pKS482; двойные трансгенные векторы, pKS482, затем линеаризуют с помощью эндонуклеазы рестрикции Sac II и трансформируют в штамм YCT306 K. lactis путем электропорации. Полученные колонии дрожжей затем выращивают на чашке с агаром YCB с добавлением 5 мМ ацетамида, который могут эффективно использовать только клетки, экспрессирующие ацетамидазу, в качестве метаболического источника азота. Для оценки колоний дрожжей можно собрать от 100 до 400 колоний с чашек с дрожжами pKS482. Каждый инокулят из колоний культивируют в 2,2 мл определенной среды для K. lactis с добавлением 2% сахарного спирта в качестве источника углерода. Культуры инкубируют при 23,5°С при встряхивании при 280 об/мин в течение шести дней, после чего плотность клеток в культурах достигает своего максимального уровня, на что указывает светопоглощение при 600 нм (OD600). Затем клетки удаляют из культур центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут, и полученные супернатанты (кондиционированные среды) фильтруют через 0,2 мкМ мембраны для анализа выхода посредством ВЭЖХ.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность с 90% сходством с последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

Химический синтез TVP

Пептидный синтез или химический синтез или пептиды и/или полипептиды могут быть использованы для создания TVP: эти способы могут быть выполнены специалистами в данной области техники и/или с использованием коммерческих поставщиков (например, GenScript®; Piscataway, Нью-Джерси). Например, в некоторых вариантах осуществления химический синтез пептидов может быть осуществлен с использованием жидкофазного синтеза пептидов (LPPS) или твердофазного синтеза пептидов (SPPS).

В некоторых вариантах осуществления пептидный синтез обычно может быть достигнут с использованием стратегии, при которой связывание карбоксильной группы последующей аминокислоты с N-концом предшествующей аминокислоты приводит к формированию новой полипептидной цепи - процесс, противоположный типу синтеза полипептидов, происходящему в природе.

Снятие защиты с пептида является важным первым шагом в химическом синтезе полипептидов. Снятие защиты пептида представляет собой процесс, при котором реакционноспособные группы аминокислот блокируют с помощью химических веществ, чтобы предотвратить участие функциональной группы указанной аминокислоты в

нежелательной, неспецифической реакции или побочной реакции; иными словами, аминокислоты «защищены» от участия в этих нежелательных реакциях.

Перед синтезом пептидной цепи аминокислоты должны быть «лишены защиты», чтобы позволить цепи сформироваться (т. е. аминокислоты могли связать). Химические вещества, используемые для защиты N-концов, включают 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) и трет-бутоксикарбонил (Boc), каждый из которых можно удалить с помощью мягкого основания (например, пиперидина) и умеренно сильной кислоты (например, трифторуксусной кислоты (TFA)), соответственно.

Требуемый защитный агент C-конца зависит от типа используемой стратегии химического синтеза пептида: например, LPPS требует защиты C-концевой аминокислоты, тогда как SPPS не требует защиты из-за твердой подложки, которая действует как защитная группа. Аминокислоты боковой цепи требуют использования нескольких различных защитных групп, которые варьируются в зависимости от последовательности отдельного пептида и стратегии защиты N-конца; однако обычно защитная группа, используемая для аминокислот боковой цепи, основана на трет-бутильной (tBu) или бензильной (Bzl) защитных группах.

Связывание аминокислот является следующим шагом в процедуре синтеза пептидов. Чтобы осуществить связывание аминокислот, необходимо активировать C-концевую карбоновую кислоту входящей аминокислоты: это можно осуществить с помощью карбодиимидов, таких как диизопропилкарбодиимид (DIC) или дициклогексилкарбодиимид (DCC), которые реагируют с карбоксильной группой входящей аминокислоты с образованием промежуточного соединения O-ациломочевины. Промежуточное соединение O-ациломочевины впоследствии замещается посредством нуклеофильной атаки через первичную аминогруппу на N-конце растущей пептидной цепи. Реакционноспособное промежуточное соединение, генерируемое карбодиимидами, может привести к рацемизации аминокислот. Чтобы избежать рацемизации аминокислот, добавляют реагенты, такие как 1-гидроксибензотриазол (HOBt), для реакции с промежуточным продуктом O-ациломочевины. Другие связывающие агенты, которые можно использовать, включают 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU) и бензотриазол-1-ил-окси-трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), с дополнительными активирующими основаниями. Наконец, с последующим снятием защиты с аминокислоты и связыванием,

В конце процесса синтеза должно произойти удаление защитных групп с полипептида - процесс, который обычно происходит посредством ацидолиза. Определение того, какой реагент требуется для расщепления пептида, зависит от используемой схемы защиты и общего метода синтеза. Например, в некоторых вариантах осуществления бромистый водород (HBr); фтористый водород (HF) или трифторметансульфоновую кислоту (TFMSA) можно использовать для расщепления групп Bzl и Boc. Альтернативно, в других вариантах осуществления менее сильная кислота, такая как TFA, может вызывать ацидолиз групп tBut и Fmoc. Наконец, пептиды

можно очищать на основе физико-химических характеристик пептида (например, заряда, размера, гидрофобности и т. д.). Методы, которые можно использовать для очистки пептидов, включают методы очистки, включающие хроматографию с обращенной фазой (RPC); эксклюзионную хроматографию; распределительную хроматографию; высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и ионообменную хроматографию (IEC).

Примеры методов синтеза пептидов можно найти в Anderson G.W. и McGregor A.C. (1957) T-butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. Journal of the American Chemical Society. 79, 6180-3; Carpino L. A. (1957) Oxidative reactions of hydrazines. Iv. Elimination of nitrogen from 1, 1-disubstituted-2-arenesulfonhydrazides1-4. Journal of the American Chemical Society. 79, 4427-31; McKay F. C. and Albertson N. F. (1957) New amine-masking groups for peptide synthesis. Journal of the American Chemical Society. 79, 4686-90; Merrifield R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society. 85, 2149-54; Carpino L. A. and Han G. Y. (1972) 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. The Journal of Organic Chemistry. 37, 3404-9 и A Lloyd-Williams P. et al. (1997) Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Boca Raton: CRC Press. 278; патентах США № 3714140 (подан 16 марта 1971 г.); 4411994 (подан 8 июня 1978 г.); № 7785832 (подан 20 января 2006 г.); № 8314208 (подан 10 февраля 2006 г.) и № 10442834 (подан 2 октября 2015 г.); и заявке на патент США № 2005/0165215 (поданной 23 декабря 2004 г.), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Иллюстративные способы

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету

экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X1, X2, X3, X4 или X5; и при этом X7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну

аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в

клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор представляет собой плазмиду, содержащую сигнал альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету

экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом сигнал альфа-MF способен экспрессировать сигнальный пептид альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор трансформируют в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого

типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку или прокариотическую клетку.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях,

обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, выбранную из любого вида родов Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP секретируется в питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом

указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этомTVP секретируется в питательную среду, при этом TVP функционально связан с сигнальным пептидом альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; а X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP обеспечивает выход: по меньшей мере 70 мг/л, по меньшей мере 80 мг/л, по меньшей мере 90 мг/л, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 110 мг/л, по меньшей мере 120 мг/л , по меньшей мере 130 мг/л, по меньшей мере 140 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 160 мг/л, по меньшей мере 170 мг/л, по меньшей мере 180 мг/л, по меньшей мере 190 мг/л 200 мг/л, по меньшей мере 500 мг/л, по меньшей мере 750 мг/л, по меньшей мере 1000 мг/л, по меньшей мере 1250 мг/л, по меньшей мере 1500 мг/л, по меньшей мере 1750 мг/л, по меньшей мере 2000 мг /л, по меньшей мере 2500 мг/л, по меньшей мере 3000 мг/л, по меньшей мере 3500 мг/л, по меньшей мере 4000 мг/л, по меньшей мере 4500 мг/л, по меньшей мере 5000 мг/л, по меньшей мере 5500 мг/л, по меньшей мере 6000 мг/л, по меньшей мере 6500 мг/л, по меньшей мере 7000 мг/л, по меньшей мере 7500 мг/л, по меньшей мере 8000 мг/л, по меньшей мере 8500 мг/л, по меньшей мере 9000 мг/л, по

меньшей мере 9 500 мг/л, по меньшей мере 10000 мг/л, по меньшей мере 12500 мг/л, по меньшей мере 15000 мг/л, по меньшей мере 17500 мг/л, по меньшей мере 20000 мг/л, по меньшей мере 25000 мг/л, по меньшей мере 30000 мг/л, по меньшей мере 40000 мг/л, по меньшей мере 50000 мг/л или по меньшей мере 100000 мг/л TVP на литр среды для культивирования дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP обеспечивает выход по меньшей мере 100 мг/л TVP на литр среды.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии одного TVP в среде.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-

инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии слитого полимера TVP, содержащего два или более полипептидов TVP, в среде.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии или TVP другой кассеты экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом кассета экспрессии способна кодировать TVP, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2

представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; (b) введение вектора в клетку-хозяин; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный

кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом X_1 представляет собой Q; и Z_1 представляет собой A.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом

указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор представляет собой плазмиду, содержащую сигнал альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом сигнал альфа-MF способен экспрессировать сигнальный пептид альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом

указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор трансформируют в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин является эукариотической клеткой или прокариотической клеткой.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, выбранную из любого вида родов Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом клетка-хозяин представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP секретируется в питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP функционально связан с сигнальным пептидом альфа-MF.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; а Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина; и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP обеспечивает выход: по меньшей мере 70 мг/л, по меньшей мере 80 мг/л, по меньшей мере 90 мг/л, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 110 мг/л, по меньшей мере 120 мг/л, по меньшей мере 130 мг/л, по меньшей мере 140 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 160 мг/л, по меньшей мере 170 мг/л, по меньшей мере 180 мг/л, по меньшей мере 190 мг/л, по меньшей мере 200 мг/л, по меньшей мере 500 мг/л, по меньшей мере 750 мг/л, по меньшей мере 1000 мг/л, по меньшей мере 1250 мг/л, по меньшей мере 1500 мг/л, по меньшей мере 1750 мг/л, по меньшей мере 2000 мг/л, по меньшей мере 2500 мг/л, по меньшей мере 3000 мг/л, по меньшей мере 3500 мг/л, по меньшей мере 4000 мг/л, по меньшей мере 4500 мг/л, по меньшей мере 5000 мг/л, по меньшей мере 5500 мг/л, по меньшей мере 6000 мг/л, по меньшей мере 6500 мг/л, по меньшей мере 7000 мг/л, по меньшей мере 7500 мг/л, по меньшей мере 8000 мг/л, по меньшей мере 8500 мг/л, по меньшей мере 9000 мг/л, по меньшей мере 9500 мг/л, по меньшей мере 10000 мг/л, по меньшей мере 12500 мг/л, по меньшей мере 15000 мг/л, по меньшей мере 17500 мг/л, по меньшей мере 20000 мг/л, по меньшей мере 25000 мг/л, по меньшей мере 30000 мг/л, по меньшей мере 40000 мг/л, по меньшей мере 50000 мг/л или по меньшей мере 100000 мг/л TVP на литр среды для культивирования дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом

указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP обеспечивает выход по меньшей мере 100 мг/л TVP на литр среды.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии одного TVP в среде.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии слитого полимера TVP, содержащего два или более полипептидов TVP, в среде.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом

указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии или TVP другой кассеты экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом кассета экспрессии способна кодировать TVP, указанный в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный

кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления способ получения TVP или TVP-инсектицидного белка включает: (a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, при этом первая кассета экспрессии содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; (b) введение вектора в клетку-хозяина и (c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP; при этом X_1 представляет собой Q; и Z_1 представляет собой A.

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА И МЕТОДЫ ТРАНСФОРМАЦИИ

Термины «трансформация» и «трансфекция» описывают процесс введения экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК в организм-хозяина. Как правило,

специалисты в данной области техники иногда используют термин «трансформация» для описания процессов, при которых экзогенная и/или гетерологичная ДНК или РНК вводятся в бактериальную клетку; и используют термин «трансфекция» для процессов, описывающих введение экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК в эукариотические клетки. Однако в настоящем документе термины «трансформация» и «трансфекция» используются как синонимы, независимо от того, описывает ли процесс введение экзогенной и/или гетерологичной ДНК или РНК в прокариоты (например, бактерии) или эукариоты (например, дрожжи, растения или животных).

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может быть трансформирована с использованием следующих способов: электропорация; сжатие клеток; микроинъекция; импалефекция; использование гидростатического давления; сонопорация; оптическая трансфекция; непрерывная инфузия; липофекция; посредством использования вирусов, таких как аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус, вирус простого герпеса и ретровирус; химический фосфатный метод; эндоцитоз через ДЭАЭ-декстран или полиэтиленимин (ПЭИ); слияние протопластов; гидродинамическая подача; магнитофекция; нуклеоинфекция и/или другие. Примеры методов трансфекции и/или трансформации можно найти в Makrides (2003), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elvesier; Wong, TK & Neumann, E. Electric field mediated gene transfer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 584-587 (1982); Potter & Heller, Transfection by Electroporation. Curr Protoc Mol Biol. 2003 May; CHAPTER: Unit-9.3; Kim & Eberwine, Mammalian cell transfection: the present and the future. Anal Bioanal Chem. 2010 Aug; 397(8): 3173-3178, каждая из этих ссылок полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Электропорация - это метод, при котором к клеткам прикладывается электричество, в результате чего клеточная мембрана становится проницаемой; это, в свою очередь, позволяет вводить экзогенную ДНК в клетки. Электропорация хорошо известна специалистам в данной области, а инструменты и устройства, необходимые для осуществления электропорации, имеются в продаже (например, системы электропорации Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad®; система трансфекции для электропорации Neon®, Thermo-Fisher Scientific и другие инструменты и/или устройства). Типичные способы электропорации проиллюстрированы в Potter & Heller, Transfection by Electroporation. Curr Protoc Mol Biol. 2003 May; CHAPTER: Unit-9.3; Saito (2015) Electroporation Methods in Neuroscience. Springer press; Pakhomov et al., (2017) Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine. Taylor & Francis; содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления электропорация может быть использована для введения вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий TVP, в дрожжи, например, TVP, клонированный в плазмиду pKlac1 и трансформированный в клетки K. lactis с помощью электропорации, может быть выполнена путем инокуляции примерно 10-200 мл дрожжевого экстракта пептон-декстроза (YEPD) подходящими видами

дрожжей, например, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, и т. д., и инкубации на шейкере при 30°C до ранней экспоненциальной фазы культуры дрожжей (например, около 0,6-2×10^8 клеток/мл); сбора дрожжей в стерильную центрифужную пробирку и центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 минут при 4°C (примечание: держите клетки в охлажденном состоянии во время процедуры), промывания клеток 40 мл ледяной стерильной деионизированной воды и осаждения клеток при 23000 об/мин в течение 5 минут; повторения этапа промывки и ресуспендирования клеток в 20 мл 1M ферментируемого сахара, например, галактозы, мальтозы, латотриозы, сахарозы, фруктозы или глюкозы, и/или сахарного спирта, например, эритрита, гидрированных гидролизатов крахмала, изомальта, лактита, мальтита, маннита и ксилита, с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут; ресуспендирования клеток с надлежащим объемом ледяного 1M ферментируемого сахара, т.е. галактозы, мальтозы, латотриозы, сахарозы, фруктозы или глюкозы, и/или сахарного спирта, например, эритрита, гидрированных гидролизатов крахмала, изомальта, лактита, мальтита, маннита и ксилита до конечной плотности клеток 3×10^9 клеток/мл; смешивания 40 мкл дрожжевой суспензии с около 1-4 мкл вектора, содержащего линейный полинуклеотид, кодирующий TVP (~1 мкг), в предварительно охлажденной кювете для электропорации диаметром 0,2 см (примечание: убедитесь, что образец находится в контакте с обеими сторонами алюминиевой кювета); обеспечения одиночного импульса при 2000 В для оптимального постоянного времени 5 мс RC-цепи, затем клетки восстанавливали в 0,5 мл YED и 0,5 мл 1M ферментируемого сахара, например, галактозы, мальтозы, латотриозы, сахарозы, фруктозы или глюкозы и/или сахарного спирта, например, эритрита, гидрированных гидролизатов крахмала, изомальта, лактита, мальтита, маннита и смеси ксилита, а затем распределяют по селективным чашкам.

В некоторых вариантах осуществления электропорация может быть использована для введения вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий TVP, в протопласты растений путем инкубации стерильного растительного материала в растворе протопластов (например, около 8 мл 10 мМ 2-[N-морфолино]этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,5; 0,01% (масс./об.) пектилазы; 1% (масс./об.) мацерозима; 40 мМ $CaCl_2$ и 0,4 М маннита) и добавления смеси на роторный шейкер в течение около 3-6 часов при 30°C для получения протопластов; удаления дебриса с помощью фильтрации через нейлоновое сито с размером 80 мкм-меш; промывания сита около 4 мл буфера для электропорации растений (например, 5 мМ $CaCl_2$, 0,4 М маннита и ФСБ); объединения протопластов в стерильной конической центрифужной пробирке объемом 15 мл с последующим центрифугированием при около 300×g в течение примерно 5 минут; последующего центрифугирования, отбрасывания супернатанта и промывки 5 мл растительного буфера для электропорации; ресуспендирования протопластов в растительном буфере для электропорации в количестве от около 1,5×10^6 до 2×10^6 протопластов на мл жидкости; переноса около 0,5 мл суспензии протопластов в одну или несколько кювет для электропорации, установки

на лед и добавления вектора (примечание: для стабильной трансформации вектор следует линеаризовать с использованием любого из методов рестрикции, описанных выше, и можно использовать от 1 до 10 мкг вектора; для временной экспрессии вектор можно сохранить в суперспиральном состоянии, и можно использовать от 10 до 40 мкг вектора); смешивания вектора и суспензии протопластов; помещения кюветы в аппарат для электропорации и подвержения одному или нескольким ударам током при напряжении около 1-2 кВ (первоначально можно использовать емкость от 3 до 25 мкФ при оптимизации реакции); возвращения кюветы на лед; 20-кратного разведения трансформированных клеток в полной среде; и сбора протопластов через около 48 часов.

Клетки-хозяева

Способы, композиции и TVP по настоящему изобретению могут быть реализованы в клетках любого типа, например в эукариотических или прокариотических клетках.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть прокариотической. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой архебактерии или эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают Escherichia (например, E. coli), Bacilli (например, B. subtilis), Enterobacteria, Pseudomonas species (например, P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla или Paracoccus.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть одноклеточной клеткой. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой бактериальные клетки, такие как грамположительные бактерии.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой бактерию, выбранную из следующих родов, состоящих из Candidatus Chloracidobacterium, Arthrobacter, Corynebacterium, Frankia, Micrococcus, Mycobacterium, Propionibacterium, Streptomyces, Aquifex Bacteroides, Porphyromonas, Bacteroides, Porphyromonas, Flavobacterium, Chlamydia, Prosthecobacter, Verrucomicrobium, Chloroflexus, Chroococcus, Merismopedia, Synechococcus, Anabaena, Nostoc, Spirulina, Trichodesmium, Pleurocapsa, Prochlorococcus, Prochloron, Bacillus, Listeria, Staphylococcus, Clostridium, Dehalobacter, Epulopiscium, Ruminococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Erysipelothrix, Mycoplasma, Leptospirillum, Nitrospira, Thermodesulfobacterium, Gemmata, Pirellula, Planctomyces, Caulobacter, Agrobacterium, Bradyrhizobium, Brucella, Methylobacterium, Prosthecomicrobium, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Sinorhizobium, Rhodobacter, Roseobacter, Acetobacter, Rhodospirillum, Rickettsia, Rickettsia conorii, Mitochondria, Wolbachia, Erythrobacter, Erythromicrobium, Sphingomonas, Alcaligenes, Burkholderia, Leptothrix, Sphaerotilus, Thiobacillus, Neisseria, Nitrosomonas, Gallionella, Spirillum, Azoarcus, Aeromonas, Succinomonas, Succinivibrio, Ruminobacter, Nitrosococcus, Thiocapsa, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Wigglesworthia, Yersinia, Coxiella,

Legionella, Halomonas, Pasteurella, Acinetobacter, Azotobacter, Pseudomonas, Psychrobacter, Beggiatoa, Thiomargarita, Vibrio, Xanthomonas, Bdellovibrio, Campylobacter, Helicobacter, Myxococcus, Desulfosarcina, Geobacter, Desulfuromonas, Borrelia, Leptospira, Treponema, Petrotoga, Thermotoga, Deinococcus или Thermus.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть выбрана из одного из следующих видов бактерий: Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Streptomyces lividans, Streptomyces murinus, Streptomyces coelicolor, Streptomyces albicans, Streptomyces griseus, Streptomyces plicatosporus, Escherichia albertii, Escherichia blattae, Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Escherichia senegalensis, Escherichia vulneris, Pseudomonas abietaniphila, Pseudomonas agarici, Pseudomonas agarolyticus, Pseudomonas alcaliphila, Pseudomonas alginovora, Pseudomonas andersonii, Pseudomonas antarctica, Pseudomonas asplenii, Pseudomonas azelaica, Pseudomonas batumici, Pseudomonas borealis, Pseudomonas brassicacearum, Pseudomonas chloritidismutans, Pseudomonas cremoricolorata, Pseudomonas diterpeniphila, Pseudomonas filiscindens, Pseudomonas frederiksbergensis, Pseudomonas gingeri, Pseudomonas graminis, Pseudomonas grimontii, Pseudomonas halodenitrificans, Pseudomonas halophila, Pseudomonas hibiscicola, Pseudomonas hydrogenovora, Pseudomonas indica, Pseudomonas japonica, Pseudomonas jessenii, Pseudomonas kilonensis, Pseudomonas koreensis, Pseudomonas lini, Pseudomonas lurida, Pseudomonas lutea, Pseudomonas marginata, Pseudomonas meridiana, Pseudomonas mesoacidophila, Pseudomonas pachastrellae, Pseudomonas palleroniana, Pseudomonas parafulva, Pseudomonas pavonanceae, Pseudomonas proteolyica, Pseudomonas psychrophila, Pseudomonas psychrotolerans, Pseudomonas pudica, Pseudomonas rathonis, Pseudomonas reactans, Pseudomonas rhizosphaerae, Pseudomonas salmononii, Pseudomonas thermaerum, Pseudomonas thermocarboxydovorans, Pseudomonas thermotolerans, Pseudomonas thivervalensis, Pseudomonas umsongensis, Pseudomonas vancouverensis, Pseudomonas wisconsinensis, Pseudomonas xanthomarina Pseudomonas xiamenensis, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas anguilliseptica, Pseudomonas citronellolis, Pseudomonas flavescens, Pseudomonas jinjuensis, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas oleovorans, Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas resinovorans, Pseudomonas straminae, Pseudomonas aurantiaca, Pseudomonas chlororaphis, Pseudomonas fragi, Pseudomonas lundensis, Pseudomonas taetrolens Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas brenneri, Pseudomonas cedrina, Pseudomonas congelans, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas costantinii, Pseudomonas extremorientalis, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fulgida, Pseudomonas gessardii, Pseudomonas libanensis, Pseudomonas mandelii, Pseudomonas marginalis, Pseudomonas mediterranea, Pseudomonas migulae, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas orientalis, Pseudomonas poae, Pseudomonas rhodesiae, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas

tolaasii, Pseudomonas trivialis, Pseudomonas veronii Pseudomonas denitrificans, Pseudomonas pertucinogena, Pseudomonas fulva, Pseudomonas monteilii, Pseudomonas mosselii, Pseudomonas oryzihabitans, Pseudomonas plecoglossicida, Pseudomonas putida, Pseudomonas balearica, Pseudomonas luteola или Pseudomonas stutzeri. Pseudomonas avellanae, Pseudomonas cannabina, Pseudomonas caricapapyae, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas coronafaciens, Pseudomonas fuscovaginae, Pseudomonas tremae или Pseudomonas viridiflava

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть эукариотной.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой клетку, принадлежащую к кладам: Opisthokonta; Viridiplantae (например, водоросли и растения); Amebozoa; Cercozoa; Alveolata; Marine flagellates; Heterokonta; Discicristata или Excavata.

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть осуществлены с использованием клетки-хозяина, которая представляет собой, например, Metazoan, Choanoflagellata или грибы.

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть осуществлены с использованием клетки-хозяина, представляющей собой гриб. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой клетку, принадлежащую к типам эукариот: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Microsporidia или Zygomycota

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены с использованием клетки-хозяина, которая представляет собой грибы, принадлежащие к одному из следующих родов: Aspergillus, Cladosporium, Magnaporthe, Morchella, Neurospora, Penicillium, Saccharomyces, Cryptococcus или Ustilago.

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные здесь, могут быть выполнены с использованием клетки-хозяина, которая представляет собой гриб, принадлежащий к одному из следующих видов: Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardi, Saccharomyces uvarum; Aspergillus flavus, A. terreus, A. awamori; Cladosporium elatum, Cl. Herbarum, Cl. Sphaerospermum *и* Cl. Cladosporioides; Magnaporthe grise, Magnaporthe oryzae, Magnaporthe rhizophila; Morchella deliciosa, Morchella esculenta, Morchella conica; Neurospora crassa, Neurospora intermedia, Neurospora tetrasperma; Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum, Penicillium roquefortii или Penicillium simplicissimum.

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть осуществлены с использованием клетки-хозяина, которая представляет собой Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae или Pichia pastoris.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой грибы,

принадлежащие к одному из следующих родов: Aspergillus, Cladosporium, Magnaporthe, Morchella, Neurospora, Penicillium, Saccharomyces, Cryptococcus или Ustilago.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть членом семейства Saccharomycetaceae. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может относиться к одному из следующих родов семейства Saccharomycetaceae: Brettanomyces, Candida, Citeromyces, Cyniclomyces, Debaryomyces, Issatchenkia, Kazachstania, Kluyveromyces, Komagataella, Kuraishia, Lachancea, Lodderomyces, Nakaseomyces, Pachysolen, Pichia, Saccharomyces, Spathaspora, Tetrapisispora, Vanderwaltozyma, Torulaspora, Williopsis, Zygosaccharomyces или Zygotorulaspora.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть одной из следующих: Aspergillus flavus, Aspergillus terreus, Aspergillus awamori, Cladosporium elatum, Cladosporium Herbarum, Cladosporium Sphaerospermum, Cladosporium cladosporioides, Magnaporthe grisea, Magnaporthe oryzae, Magnaporthe rhizophila, Morchella deliciosa, Morchella esculenta, Morchella conica, Neurospora crassa, Neurospora intermedia, Neurospora tetrasperma, Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum, Penicillium roquefortii *или Penicillium simplicissimum.*

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой вид рода Candida. Например, клетка-хозяин может быть одной из следующих: Candida albicans, Candida ascalaphidarum, Candida amphixiae, Candida antarctica, Candida argentea, Candida atlantica, Candida atmosphaerica, Candida auris, Candida blankii, Candida blattae, Candida bracarensis, Candida bromeliacearum, Candida carpophila, Candida carvajalis, Candida cerambycidarum, Candida chauliodes, Candida corydalis, Candida dosseyi, Candida dubliniensis, Candida ergatensis, Candida fructus, Candida glabrata, Candida fermentati, Candida guilliermondii, Candida haemulonii, Candida humilis, Candida insectamens, Candida insectorum, Candida intermedia, Candida jeffresii *или* Candida kefyr.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой вид рода Kluyveromyces. Например, клетка-хозяин может быть одной из следующих: Kluyveromyces aestuarii, Kluyveromyces dobzhanskii, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces nonfermentans или Kluyveromyces wickerhamii.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой вид рода Pichia. Например, клетка-хозяин может быть одной из следующих: Pichia farinose, Pichia anomala, Pichia heedii, Pichia guilliermondii, Pichia kluyveri, Pichia membranifaciens, Pichia norvegensis, Pichia ohmeri, Pichia pastoris, Pichia methanolica или Pichia subpelliculosa.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой вид рода

Saccharomyces. Например, клетка-хозяин может быть одной из следующих: Saccharomyces arboricolus, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces bulderi, Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces cariocus, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces cerevisiae var boulardii, Saccharomyces chevalieri, Saccharomyces dairenensis, Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomyces eubayanus, Saccharomyces exiguous, Saccharomyces florentinus, Saccharomyces fragilis, Saccharomyces kudriavzevii, Saccharomyces martiniae, Saccharomyces mikatae, Saccharomyces monacensis, Saccharomyces norbensis, Saccharomyces paradoxus, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces spencerorum, Saccharomyces turicensis, Saccharomyces unisporus, Saccharomyces uvarum или Saccharomyces zonatus.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продуцирования TVP или TVP-инсектицидного белка, может быть одной из следующих: Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Pichia methanolica, Schizosaccharomyces pombe *или Hansenula anomala.*

Использование дрожжевых клеток в качестве организма-хозяина для получения рекомбинантного TVP является исключительным методом, хорошо известным специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять с любыми видами дрожжей, включая, помимо прочего, любые виды рода Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces, а вид Saccharomyces включает в себя любые виды Saccharomyces, например, виды Saccharomyces cerevisiae, выбранные из следующих штаммов: INVSc1, YNN27, S150-2B, W303-1B, CG25, W3124, JRY188, BJ5464, AH22, GRF18, W303-1A и BJ3505. В некоторых вариантах осуществления представители видов Pichia, включая любые виды Pichia, например виды Pichia, Pichia pastoris, например, Pichia pastoris выбраны из следующих штаммов: Bg08, Y-11430, X-33, GS115, GS190, JC220, JC254, GS200, JC227, JC300, JC301, JC302, JC303, JC304, JC305, JC306, JC307, JC308, YJN165, KM71, MC100-3, SMD1163, SMD1165, SMD1168, GS241, MS105, любой pep4-нокаутный штамм и любой prb1-нокаутный штамм, а также Pichia pastoris, выбранные из следующих штаммов: Bg08, X-33, SMD1168 и KM71. В некоторых вариантах осуществления для осуществления описанных в данном документе способов можно использовать любые виды Kluyveromyces, включая любые виды Kluyveromyces, например, Kluyveromyces lactis, и мы утверждаем, что штамм Kluyveromyces lactis может быть, но не обязательно, выбран из следующих штаммов: GG799, YCT306, YCT284, YCT389, YCT390, YCT569, YCT598, NRRL Y-1140, MW98-8C, MS1, CBS293.91, Y721, MD2/1, PM6-7A, WM37, K6, K7, 22AR1, 22A295-1, SD11, MG1/2, MSK110, JA6, CMK5, HP101, HP108 и PM6-3C, в дополнение к видам Kluyveromyces lactis, выбраным из GG799, YCT306 и NRRL Y-1140.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Aspergillus oryzae.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для

продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Aspergillus japonicas.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Aspergillus niger.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Bacillus licheniformis.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Bacillus subtilis.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для продукции TVP или TVP-инсектицидного белка, может представлять собой Trichoderma reesei.

В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены с использованием клетки-хозяина, которая представляет собой дрожжи, включая, помимо прочего, любые виды рода Hansenula, включая любые виды Hansenula и предпочтительно Hansenula polymorpha. В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены с любыми видами дрожжей, включая, помимо прочего, любые виды Yarrowia, например, Yarrowia lipolytica. В некоторых вариантах осуществления процедуры и способы, описанные в данном документе, могут быть осуществлены с любыми видами дрожжей, включая, помимо прочего, любые виды рода Schizosaccharomyces, включая любые виды Schizosaccharomyces и предпочтительно Schizosaccharomyces pombe.

В некоторых вариантах осуществления в качестве организма-хозяина можно использовать виды дрожжей, такие как Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris и другие. Методы культивирования дрожжевых клеток хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры методов культивирования дрожжевых клеток можно найти в Evans, Yeast Protocols. Springer (1996); Bill, Recombinant Protein Production in Yeast. Springer (2012); Hagan et al., Fission Yeast: A Laboratory Manual, CSH Press (2016); Konishi et al., Improvement of the transformation efficiency of Saccharomyces cerevisiae by altering carbon sources in pre-culture. Biosci Biotechnol Biochem. 2014; 78(6):1090-3; Dymond, Saccharomyces cerevisiae growth media. Methods Enzymol. 2013; 533:191-204; Looke et al., Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques. 2011 May; 50(5):325-8 и Romanos et al., Culture of yeast for the production of heterologous proteins. Curr Protoc Cell Biol. 2014 Sep 2; 64:20.9.1-16, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Рецептуры сред и исходных растворов для ферментации для дрожжевых клеток описаны следующим образом: (1) рецептура среды MSM: 2 г/л дигидрата цитрата натрия; 1 г/л дигидрата сульфата кальция (0,79 г/л безводного сульфата кальция); 42,9 г/л

одноосновного фосфата калия; 5,17 г/л сульфата аммония; 14,33 г/л сульфата калия; 11,7 г/л гептагидрата сульфата магния; 2 мл/л раствора солей микроэлементов PTM1; 0,4 частей на миллион биотина (из 500X, 200 частей на миллион исходного раствора); 1-2% чистого глицерина или другого источника углерода. (2) раствор солей микроэлементов PTM1: сульфат меди-5H2O 6,0 г; йодид натрия 0,08 г; сульфат марганца-H2O 3,0 г; молибдат натрия-$2H_2O$ 0,2 г; борная кислота 0,02 г; хлорид кобальта 0,5 г; хлорид цинка 20,0 г; сульфат железа-$7H_2O$ 65,0 г; биотин 0,2 г; серная кислота 5,0 мл; добавить воды до конечного объема 1 литр. Иллюстративный состав среды для определения K. lactis (DMSor) следующий: 11,83 г/л KH_2PO_4, 2,299 г/л K_2HPO_4, 20 г/л ферментируемого сахара, например, галактозы, мальтозы, латотриозы, сахарозы, фруктозы или глюкозы, и/или сахарного спирта, например, эритрита, гидрированных гидролизатов крахмала, изомальта, лактита, мальтита, маннита и ксилита, 1 г/л $MgSO_4.7H_2O$, 10 г/л $(NH_4)SO_4$, 0,33 г/л $CaCl_2.2H_2O$, 1 г/л NaCl, 1 г/л KCl, 5 мг/л $CuSO_4.5H_2O$, 30 мг/л $MnSO_4.H_2O$, 10 мг/л $ZnCl_2$, 1 мг/л KI, 2 мг/л $CoCl_2.6H_2O$, 8 мг/л $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0,4 мг/л H_3BO_3, 15 мг/л $FeCl_3.6H_2O$, 0,8 мг/л биотина, 20 мг/л Ca-пантотената, 15 мг/л тиамина, 16 мг/л мио-инозитола, 10 мг/л никотиновой кислоты и 4 мг/л пиридоксина.

Дрожжевые клетки можно культивировать в 48-луночных планшетах с глубокими лунками, закрытых после инокуляции стерильной воздухопроницаемой крышкой. Колонии дрожжей, например, K. lactis, культивированные на чашках, можно собрать и инокулировать в планшеты с глубокими лунками с 2,2 мл среды на лунку, состоящей из DMSor. Инокулированные планшеты с глубокими лунками можно выращивать в течение 6 дней при температуре 23,5°C при встряхивании со скоростью 280 об/мин в охлаждаемом инкубаторе-шейкере. На 6-й день после инокуляции кондиционированные среды следует собрать путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 минут с последующей фильтрацией с использованием фильтровальной пластины с мембраной 0,22 мкМ, при этом отфильтрованные среды подвергают анализу ВЭЖХ.

Иллюстративные штаммы дрожжей

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V,

M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; и при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом

полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарную ей нуклеотидную последовательность

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей выбран из любых видов родов Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей дрожжевой клетки выбран из группы, состоящей из Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

ФОРМУЛА (II)

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной

последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом X_1 представляет собой Q; а Z_1 представляет собой A.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей

выбран из любых видов родов Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей дрожжевой клетки выбран из группы, состоящей из Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению может содержать: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность; при этом штамм дрожжей представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

Трансформация дрожжей, очистка TVP и анализ

Примерный способ трансформации дрожжей заключается в следующем: векторы экспрессии, несущие ОРС экспрессии TVP, трансформируют в дрожжевые клетки. Во-первых, векторы экспрессии обычно линеаризуют расщеплением специфическими ферментами рестрикции, чтобы облегчить хромосомную интеграцию посредством гомологичной рекомбинации. Затем линейный вектор экспрессии трансформируют в дрожжевые клетки химическим способом или методом электропорации и интегрируют в целевой локус генома дрожжей путем гомологичной рекомбинации. Интеграция может происходить в одном и том же локусе хромосомы несколько раз; следовательно, геном трансформированной дрожжевой клетки может содержать несколько копий кассет экспрессии TVP. Успешно трансформированные дрожжевые клетки могут быть идентифицированы с использованием условий роста, которые благоприятствуют селективному маркеру, встроенному в вектор экспрессии и коинтегрированному в хромосомы дрожжей с ОРС экспрессии TVP; примеры таких маркеров включают, помимо прочего, прототрофию ацетамида, устойчивость к зеоцину, устойчивость к генетицину,

устойчивость к ноурсеотрикину и прототрофию к урацилу.

Из-за влияния непредсказуемых и изменчивых факторов, таких как эпигенетическая модификация генов и сетей генов, а также вариации числа событий интеграции, происходящих в отдельных клетках популяции, подвергающейся процедуре трансформации, отдельные колонии дрожжей данного процесса трансформации будут различаться по своей способности продуцировать ОРС экспрессии TVP. Таким образом, колонии трансгенных дрожжей, несущие трансгены TVP, следует подвергать скринингу на наличие высокопродуктивных штаммов. Два эффективных метода такого скрининга, каждый из которых зависит от выращивания небольших культур трансгенных дрожжей для получения образцов кондиционированной среды для последующего анализа, используют ВЭЖХ с обращенной фазой или процедуры с инъекцией комнатной мухе для анализа образцов кондиционированной среды из положительных колоний трансгенных дрожжей.

Культуры трансгенных дрожжей могут быть получены с использованием полипропиленовых культуральных пробирок на 14 мл с круглым дном и добавлением в каждую пробирку от 5 до 10 мл среды с определенным составом или в 48-луночных культуральных планшетах с глубокими лунками с добавлением в каждую лунку 2,2 мл среды с определенным составом. Среду с определенным составом, не содержащую неочищенные белковые экстракты или побочные продукты, такие как дрожжевой экстракт или пептон, используют для культур, чтобы уменьшить белковый фон в кондиционированных средах, собранных для последующих стадий скрининга. Культивирование проводят при оптимальной температуре, например, 23,5°C для *K. lactis*, в течение примерно 5-6 дней, пока не будет достигнута максимальная плотность клеток. Теперь TVP будут продуцироваться трансформированными дрожжевыми клетками и секретироваться из клеток в питательную среду. Чтобы подготовить образцы для скрининга, клетки удаляют из культур с помощью центрифугирования, а супернатанты собирают в качестве кондиционированных сред, которые затем очищают путем фильтрации через фильтрующую мембрану 0,22 мкм и затем готовят для скрининга штаммов.

В некоторых вариантах осуществления положительные колонии дрожжей, трансформированные с помощью TVP, могут быть подвергнуты скринингу посредством скрининга предполагаемых колоний дрожжей с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (оф-ВЭЖХ). В этом методе скрининга можно использовать аналитическую колонку ВЭЖХ со связанной фазой C18. В качестве растворителей подвижной фазы используют ацетонитрил и воду, а для обнаружения пептидов используют детектор УФ-поглощения, настроенный на 220 нм. Соответствующие количества образцов кондиционированной среды загружают в систему оф-ВЭЖХ и элюируют линейным градиентом растворителей подвижной фазы. Соответствующая площадь пика инсектицидного пептида на хроматографе ВЭЖХ используется для количественного определения концентраций TVP в кондиционированных средах. Известные количества чистого TVP пропускают через ту

же колонку оф-ВЭЖХ с тем же протоколом ВЭЖХ, чтобы подтвердить время удерживания пептида и получить стандартную кривую ВЭЖХ для пептида для количественного определения.

Типичный процесс скрининга с ВЭЖХ с обращенной фазой положительных клеток K. lactis выглядит следующим образом: ОРС экспрессии TVP можно вставить в вектор экспрессии, pKLAC1, и трансформировать в штамм K. lactis, YCT306, от New England Biolabs, Ipswich, Массачусетс, США. Вектор pKLAC1 представляет собой интегративный вектор экспрессии. После того как трансгены TVP были клонированы в pKLAC1 и трансформированы в YCT306, их экспрессия контролировалась промотором LAC4. Полученные трансформированные колонии продуцировали пре-пропептиды, содержащие сигнальный пептид α-фактора спаривания, сайт расщепления Kex2 и зрелые TVP. Сигнальный пептид α-фактора спаривания направляет пре-пропептиды по пути эндогенной секреции, и зрелые TVP высвобождаются в питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления оптимизацию кодонов для экспрессии TVP можно проводить в два раунда, например, в первом раунде, на основании некоторых общих признаков последовательностей ДНК с высокой экспрессией, множественных вариантов ОРС экспрессии TVP, экспрессирующих сигнальный пептид α-фактора спаривания, конструируют сайт расщепления Kex2 и TVP и оценивают уровни их экспрессии в штамме YCT306 K. lactis, что приводит к первоначальному алгоритму экспрессии K. lactis; во втором раунде оптимизации можно разработать дополнительные варианты ОРС экспрессии TVP на основе исходного алгоритма экспрессии K. lactis для дальнейшей точной настройки алгоритма экспрессии K. lactis и определения наилучшей ОРС для экспрессии TVP в K. lactis. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, полученная в результате описанной выше оптимизации, может иметь открытую рамку считывания, кодирующую сигнальный пептид α-MF, сайт расщепления Kex2 и TVP, которые можно клонировать в вектор pKLAC1 с использованием сайтов рестрикции Hind III и Not I, что приводит к векторам экспрессии TVP.

В некоторых вариантах осуществления дрожжи Pichia pastoris можно трансформировать кассетой экспрессии TVP. Примерный способ трансформации P. pastoris заключается в следующем: векторы pJUGαKR и pJUZαKR можно использовать для трансформации TVP в P. pastoris. Векторы pJUGαKR и pJUZαKR доступны от Biogrammatics, Карлсбад, Калифорния, США. Оба вектора являются интегративными векторами и используют промотор урацилфосфорибозилтрансферазы (pUPP) для усиления экспрессии гетерологичного трансгена. Единственное различие между векторами состоит в том, что pJUGαKR обеспечивает устойчивость к G418 дрожжей-хозяев, тогда как pJUZαKR обеспечивает устойчивость к зеоцину. Пары комплементарных олигонуклеотидов, кодирующих TVP, конструируют и синтезируют для субклонирования в два вектора экспрессии дрожжей. Реакции гибридизации проводят путем смешивания соответствующих комплементарных олигонуклеотидов до конечной концентрации 20

мкМ в 30 мМ NaCl, 10 мМ Трис-Cl (все конечные концентрации), pH 8, а затем инкубируют при 95°C в течение 20 мин с последующим 9-часовая инкубация, начиная с 92°C и заканчивая 17°C, со снижением температуры на 3°C каждые 20 мин. Реакции гибридизации приведут к получению фрагментов ДНК, кодирующих TVP. Два вектора P. pastoris расщепляются рестрикционными ферментами BsaI-HF, а затем двухцепочечные ДНК продукты реакции субклонируют в линеаризованные векторы P. pastoris с использованием стандартных процедур. После проверки последовательностей субклонов аликвоты плазмид трансфицировали путем электропорации в штамм P. pastoris, Bg08. Полученные трансформированные дрожжи, отобранные на основе устойчивости к зеоцину или G418, приданной элементами, сконструированными в векторах pJUZαKR и pJUGαKR, соответственно, можно культивировать и подвергать скринингу, как описано в настоящем документе.

Скрининг и оценка выхода пептидов из дрожжей

Выход пептида можно определить любым из способов, известных специалистам в данной области техники (например, капиллярный гель-электрофорез (CGE, англ.: capillary gel electrophoresis), анализ вестерн-блоттинг и т.п.). Анализы активности, описанные в настоящем документе и известные в данной области, также могут предоставить информацию о выходе пептидов. В некоторых вариантах осуществления эти или любые другие способы, известные в данной области техники, можно использовать для оценки выхода пептида.

Количественные анализы

В некоторых вариантах осуществления и без ограничения выход пептида TVP можно измерить с помощью: HPLC; масс-спектрометрии (MC) и схожих методов; ЖХ/МС/МС; белковых матриц с обращенной фазой (RPPA); иммуногистохимии; ИФА; матрицы суспензионных гранул, масс-спектрометрии; дот-блоттинга; ДСН-ПААГ; капиллярного гель-электрофореза (CGE); анализа вестерн-блоттинг; анализа Брэдфорда; измерения УФ-поглощения при 260 нм; анализа Лоури; анализ Смита с медью/бицинхониновой кислотой; анализа секреции; анализа белка Пирса; биуретовой реакции и т.п. Примеры методов количественного определения белка представлены в Stoscheck, C. 1990 “Quantification of Protein” Methods in Enzymology , 182:50-68; Lowry, O. Rosebrough, A., Farr, A. and Randall, R. 1951 J. Biol. Chem . 193:265; Smith, P. et al., (1985) Anal. Biochem. 150:76-85; Bradford, M. 1976 “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding” Anal. Biochem. 72:248-254; Cabib, E. and Polacheck, I. 1984 “Protein assay for dilute solutions.” Methods in Enzymology, 104:318-328; Turcanu, Victor; Williams, Neil A. (2001). ”Cell identification and isolation on the basis of cytokine secretion: A novel tool for investigating immune responses.” Nature Medicine. 7 (3): 373-376; патенте США № 6391649; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В других вариантах осуществления выход пептида TVP можно количественно

определить и/или оценить с использованием способов, которые включают, помимо прочего: массу рекомбинантного белка на объем культуры (например, грамм или миллиграмм белка на литр культуры); процент или долю нерастворимого осадка рекомбинантного белка, полученного после лизиса клеток, определяемого в (например, супернатант, экстрагированный рекомбинантным белком, в количестве/количестве белка в нерастворимых компонентах); процент или доля активного белка (например, количество/анализ активного белка для использования в количестве белка); общий клеточный белок (окб) в процентах или фракциях и/или количество белка/клеток и проценты или соотношение сухой биомассы.

В некоторых вариантах осуществления, в которых выход выражается в единицах объема культуры, может учитываться плотность клеток в культуре, особенно при сравнении выходов разных культур.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ получения гетерологичного полипептида, составляющего по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75% или более от общего клеточного белка (окб). «Процент общего клеточного белка» представляет собой количество гетерологичного полипептида в клетке-хозяине в виде процента от совокупного клеточного белка. Определение процентного содержания общего клеточного белка хорошо известно в данной области техники.

«Общий клеточный белок (окб)» или «Процент общего клеточного белка (% окб)» представляет собой количество белка или полипептида в клетке-хозяине в виде процента от совокупного клеточного белка. Способы определения процента общего клеточного белка хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления для количественного определения выхода пептида можно использовать ВЭЖХ. Например, в некоторых вариантах осуществления выход пептида можно количественно определить с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенной монолитной колонкой Onyx 4,5×100 мм, аналитической колонкой C18 для ВЭЖХ с обращенной фазой и автоматическим инжектором. Иллюстративное использование системы ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенной монолитной колонкой Onyx 4,5×100 мм, аналитической колонкой C18 для ВЭЖХ с обращенной фазой и автоматическим инжектором, выглядит следующим образом: отфильтрованные образцы кондиционированных сред из трансформированных клеток K. lactis анализируют с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенной монолитной колонкой Onyx 4,5×100 мм, аналитической колонкой C18 для ВЭЖХ с обращенной фазой и автоматическим инжектором путем анализа воды для ВЭЖХ и ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, составляющих два растворителя подвижной фазы, используемые для анализа ВЭЖХ; площади пиков как TVP, так и TVP-инсектицидного белка анализируют с помощью хроматографов ВЭЖХ, а затем используют для расчета концентрации пептида в кондиционированной среде, которую

можно дополнительно нормализовать к соответствующей конечной плотности клеток (определяемой измерениями OD600) как нормализованный выход пептида.

Анализы активности

В некоторых вариантах осуществления положительные колонии дрожжей, трансформированные TVP или TVP-инсектицидным белком, можно подвергать скринингу с помощью анализа с инъекцией комнатной мухе. TVP или TVP-инсектицидный белок может парализовать/убивать комнатных мух при введении в измеренных дозах через стенку тела дорсальной части грудной клетки. Эффективность TVP или TVP-инсектицидного белка можно определить по средней паралличной/летальной дозе пептида (PD_{50}/LD_{50}), которая вызывает 50% нокдаун или смертность инъецированных комнатных мух, соответственно. Чистый TVP или TVP-инсектицидный белок обычно используют в анализе с инъекцией комнатной мухе для получения стандартной кривой доза-ответ, по которой можно определить значение PD_{50}/LD_{50}. Используя значение PD_{50}/LD_{50} из анализа стандартной кривой доза-ответ чистого TVP или TVP-инсектицидного белка, можно получить количественную оценку TVP или TVP-инсектицидного белка, продуцируемого трансформированными дрожжами, с использованием анализа с инъекцией комнатной мухе, выполненного с серийными разведениями соответствующих кондиционированных сред.

Типовой биоанализ с инъекцией комнатной мухе представляет собой следующее: кондиционированную среду серийно разбавляют для получения полных кривых доза-ответ на основе биоанализа с инъекцией комнатной мухе. Перед инъекцией взрослых комнатных мух (Musca domestica) иммобилизуют с помощью CO_2 и отбирают для инъекции 12-18 мг комнатных мух. Микроаппликатор, снабженный шприцем объемом 1 куб. см и иглой 30-го размера, используется для инъекции 0,5 мкл на муху доз серийно разбавленных образцов кондиционированной среды комнатным мухам через стенку тела дорсальной части грудной клетки. Инъецированных комнатных мух помещают в закрытые контейнеры с влажной фильтровальной бумагой и отверстиями для дыхания на крышках, и их исследуют с помощью коэффициента нокдауна или оценки смертности через 24 часа после инъекции. Рассчитывают нормализованные выходы. Выход пептида означает концентрацию пептида в кондиционированной среде в единицах мг/л. Однако выход пептидов не всегда достаточен для точного сравнения скорости продукции штаммами. Отдельные штаммы могут иметь разную скорость роста, поэтому при сборе культуры разные культуры могут различаться по плотности клеток. Культура с высокой плотностью клеток может продуцировать более высокую концентрацию пептида в среде, даже если скорость продукции пептида у штамма ниже, чем у другого штамма с более высокой скоростью продукции. Соответственно, термин «нормализованный выход» создается путем деления выхода пептида на плотность клеток в соответствующей культуре, что позволяет лучше сравнивать скорость продукции пептида между штаммами. Плотность клеток представлена светопоглощением при 600 нм с единицей «А» (единица поглощения).

Скрининг колоний дрожжей, подвергшихся трансформации с помощью TVP, может идентифицировать высокопродуктивные штаммы дрожжей из сотен потенциальных колоний. Эти штаммы можно ферментировать в биореакторе для достижения выхода TVP по меньшей мере до 4 г/л, или по меньшей мере до 3 г/л, или по меньшей мере до 2 г/л при использовании оптимизированной среды для ферментации и условий ферментации, описанных в настоящем документе. Более высокие уровни производства (выраженные в мг/л) могут составлять от около 100 мг/л до около 100 000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 90000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 80000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 70000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 60000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 50000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 40000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 30000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 20000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 17500 мг/л; или от около 100 мг/л до около 15000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 12500 мг/л; или от около 100 мг/л до около 10000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 9000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 8000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 7000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 6000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 5000 мг/л; или от около 100 мг/л до около 3000 мг/л; или от около 100 мг/л до 2000 мг/л; или от около 100 мг/л до 1500 мг/л; или от около 100 мг/л до 1000 мг/л; или от около 100 мг/л до 750 мг/л; или от около 100 мг/л до 500 мг/л; или от около 150 мг/л до 100000 мг/л; или от около 200 мг/л до 100000 мг/л; или от около 300 мг/л до 100000 мг/л; или от около 400 мг/л до 100000 мг/л; или от около 500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 750 мг/л до 100000 мг/л; или от около 1000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 1250 мг/л до 100000 мг/л; или от около 1500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 2000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 2500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 3000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 3500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 4000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 4500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 5000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 6000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 7000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 8000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 9000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 10000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 12500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 15000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 17500 мг/л до 100000 мг/л; или от около 20000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 30000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 40000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 50000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 60000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 70000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 80000 мг/л до 100000 мг/л; или от около 90000 мг/л до 100000 мг/л; или любой диапазон любого значения или даже более высокие выходы, чем могут быть достигнуты с пептидом перед конверсией, с использованием тех же или подобных способов получения, которые использовались для получения пептида до конверсии.

Культура и условия ферментации

Способы культивирования клеток хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления способ культивирования и/или материалы обязательно требуют адаптации в зависимости от выбранной клетки-хозяина; и такие приспособления

(например, изменение pH, температуры, состава среды и т.п.) хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления для получения TVP или TVP-инсектицидного белка по настоящему изобретению можно использовать любой известный способ культивирования.

Типичные методы культивирования представлены в патентах США № 3933590; 3946780; 4988623; 5153131; 5153133; 5155034; 5316905; 5330908; 6159724; 7419801; 9320816; 9714408 и 10563169; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Культура дрожжей

Методы культивирования дрожжевых клеток хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры методов культивирования дрожжевых клеток можно найти в Evans, Yeast Protocols. Springer (1996); Bill, Recombinant Protein Production in Yeast. Springer (2012); Hagan et al., Fission Yeast: A Laboratory Manual, CSH Press (2016); Konishi et al., Improvement of the transformation efficiency of Saccharomyces cerevisiae by altering carbon sources in pre-culture. Biosci Biotechnol Biochem. 2014; 78(6):1090-3; Dymond, Saccharomyces cerevisiae growth media. Methods Enzymol. 2013; 533:191-204; Looke et al., Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques. 2011 May; 50(5):325-8 и Romanos et al., Culture of yeast for the production of heterologous proteins. Curr Protoc Cell Biol. 2014 Sep 2; 64:20.9.1-16, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Дрожжи можно культивировать в различных средах, например, в некоторых вариантах осуществления дрожжи можно культивировать в минимальной среде; среде YPD; синтетической среде для отбора дрожжей; основе азотного агара для дрожжей (YNB, англ.: Yeast Nitrogen Base, с аминокислотами или без них); среде YEPD; среде ADE D; среде ADE DS", среде LEU D, среде HIS D или среде с минеральными солями.

В некоторых вариантах осуществления дрожжи можно культивировать в минимальной среде. В некоторых вариантах осуществления ингредиенты минимальной среды могут включать: 2% сахара; фосфатный буфер, pH 6,0; сульфат магния; хлорид кальция; сульфат аммония; хлорид натрия; хлорид калия; сульфат меди; сульфат марганца; хлорид цинка; йодистый калий; хлорид кобальта; молибдат натрия; борную кислоту; хлорид железа; биотин; пантотенат кальция; тиамин; мио-инозитол; никотиновую кислоту и пиридоксин.

В некоторых вариантах осуществления дрожжи можно культивировать в среде YPD. Среда YPD содержит бактериологический пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу.

В некоторых вариантах осуществления дрожжи можно культивировать в синтетической среде для отбора дрожжей, которую можно использовать для дифференциации ауксотрофных мутантных штаммов, которые не могут расти без определенного компонента среды, трансформированного плазмидой, которая позволяет указанному трансформанту расти на среде, в которой отсутствует требуемый компонент.

В некоторых вариантах осуществления дрожжи можно культивировать с

использованием основы азотного агара для дрожжей (YNB с аминокислотами или без них), которая содержит азот, витамины, микроэлементы и соли.

В некоторых вариантах осуществления среда может представлять собой среду YEPD, например, среду, содержащую 2% D-глюкозы, 2% пептона BACTO (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган), 1% дрожжевого экстракта BACTO (Difco), 0,004% аденина и 0,006% L-лейцина, или ее разновидность, где источником углерода является сахарный спирт, например, глицерин или сорбит.

В некоторых вариантах осуществления среда может представлять собой среду ADE D, например, среду, содержащую 0,056% порошка Ade-Trp-Thr, 0,67% основы азотного агара для дрожжей без аминокислот, 2% D-глюкозы и 0,5% 200-х триптофана, раствора треонина, или ее разновидность, где источником углерода является сахарный спирт, например, глицерин или сорбит.

В некоторых вариантах осуществления среда может представлять собой среду ADE DS", например, среду, содержащую 0,056% порошка Ade-Trp-Thr, 0,67% основы азотного агара для дрожжей без аминокислот, 2% D-глюкозы и 0,5% 200-х триптофана, раствора треонина и 18,22% D-сорбита, или ее разновидность, где источником углерода полностью является сахарный спирт, например, глицерин или сорбит.

В некоторых вариантах осуществления среда может представлять собой среду LEU D, например, среду, содержащую 0,052% порошка Leu-Trp-Thr, 0,67% основы азотного агара для дрожжей без аминокислот, 2% D-глюкозы и 0,5% 200-х триптофана, раствора треонина, или ее разновидность, где источником углерода является сахарный спирт, например, глицерин или сорбит..

В некоторых вариантах осуществления среда может представлять собой среду HIS D, например, среду, содержащую 0,052% порошка His-Trp-Thr, 0,67% основы азотного агара для дрожжей без аминокислот, 2% D-глюкозы и 0,5% 200-х триптофана, раствора треонина, или ее разновидность, где источником углерода является сахарный спирт, например, глицерин или сорбит.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать среду с минеральными солями. Среда с минеральными солями состоит из минеральных солей и источника углерода, такого как, например, глюкоза, сахароза или глицерин. Примеры сред с минеральными солями включают, например, среду M9, среду для Pseudomonas (ATCC 179) и среду Дэвиса и Мингиоли. *См.*, Davis & Mingioli (1950) J. Bact. 60:17-28. Минеральные соли, используемые для изготовления сред с минеральными солями, включают соли, выбранные из числа, например, фосфатов калия, сульфата или хлорида аммония, сульфата или хлорида магния и микроэлементов, таких как хлорид кальция, борат и сульфаты железа, меди, марганца и цинк. Как правило, в среду с минеральными солями не включают никаких источников органического азота, таких как пептон, триптон, аминокислоты или дрожжевой экстракт. Вместо этого используется неорганический источник азота, который может быть выбран, например, из солей аммония, водного аммиака и газообразного аммиака. Среда с минеральными солями обычно содержит

глюкозу или глицерин в качестве источника углерода.

По сравнению с средами с минеральными солями, минимальные среды также могут содержать минеральные соли и источник углерода, но могут быть дополнены, например, низкими уровнями аминокислот, витаминов, пептонов или других ингредиентов, хотя они добавляются в очень минимальных количествах. Среды могут быть приготовлены с использованием способов, описанных в данной области техники, например, в публикация патентной заявки США № 2006/0040352, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Подробности процедур культивирования и сред с минеральными солями, применимых в способах по настоящему изобретению, описаны в Riesenberg, D et al., 1991, "High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate," J. Biotechnol. 20 (1):17-27.

В некоторых вариантах осуществления Kluyveromyces lactis выращивают в минимальной среде с добавлением 2% глюкозы, галактозы, сорбита или глицерина в качестве единственного источника углерода. Культуры инкубируют при 30°C до середины логарифмической фазы (24-48 часов) для измерения β-галактозидазы или в течение 6 дней при 23,5°C для экспрессии гетерологичного белка.

В некоторых вариантах осуществления дрожжевые клетки можно культивировать в 48-луночных планшетах с глубокими лунками, закрытых после инокуляции стерильной воздухопроницаемой крышкой. Колонии дрожжей, например, K. lactis, культивированные на чашках, можно собрать и инокулировать в планшеты с глубокими лунками с 2,2 мл среды на лунку, состоящей из DMSor. Инокулированные планшеты с глубокими лунками можно выращивать в течение 6 дней при температуре 23,5°C при встряхивании со скоростью 280 об/мин в охлаждаемом инкубаторе-шейкере. На 6-й день после инокуляции кондиционированные среды следует собрать путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 минут с последующей фильтрацией с использованием фильтровальной пластины с мембраной 0,22 мкМ, при этом отфильтрованные среды подвергают анализу ВЭЖХ.

В некоторых вариантах осуществления в качестве организма-хозяина можно использовать виды дрожжей, такие как Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris и другие, и/или дрожжи, подлежащие модификации с использованием описанных в данном документе способов.

Условия температуры и pH будут варьироваться в зависимости от стадии культивирования и выбранного вида клеток-хозяев. Такие переменные, как температура и pH в клеточной культуре, легко известны специалистам в данной области техники.

Уровень pH важен при культивировании дрожжей. Специалист в данной области техники оценит, что процесс культивирования включает не только начало культивирования дрожжей, но и поддержание культуры. Культивирование дрожжей можно начинать при любом уровне pH, однако, поскольку среда для культуры дрожжей со временем становится более кислой (т. е. понижает pH), необходимо внимательно следить за уровнем pH во время процесса культивирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дрожжи выращивают в среде при уровне pH, определяемом используемыми видами дрожжей, стадией культивирования и/или температурой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления уровень pH может находиться в диапазоне от около 2 до около 10. Специалистам в данной области техники известно, что оптимальный pH для большинства микроорганизмов близок к нейтральной точке (pH 7,0). Однако в некоторых вариантах некоторые виды грибов предпочитают кислую среду: соответственно, в некоторых вариантах pH может составлять от 2 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH может находиться в диапазоне от около 4 до около 4,5. Некоторые виды грибов (например, плесневые) могут расти при pH от около 2 до около 8,5, но предпочитают кислый pH. *См.*Mountney & Gould, Practical food microbiology and technology. 1988. Ed. 3 и Pena et al., Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 2015 Mar;15(2):fou005.

В других вариантах осуществления pH составляет около от 5,7 до 5,9, от 5,8 до 6,0, от 5,9 до 6,1, от 6,0 до 6,2, от 6,1 до 6,3, от 6,2 до 6,5, от 6,4 до 6,7, от 6,5 до 6,8, от 6,6 до 6,9, от 6,7 до 7,0, от 6,8 до 7,1, от 6,9 до 7,2, от 7,0 до 7,3, от 7,1 до 7,4, от 7,2 до 7,5, от 7,3 до 7,6, от 7,4 до 7,7, от 7,5 до 7,8, от 7,6 до 7,9, от 7,7 до 8,0, от 7,8 до 8,1, от 7,9 до 8,2, от 8,0 до 8,3, от 8,1 до 8,4, от 8,2 до 8,5, от 8,3 до 8,6, от 8,4 до 8,7 или от 8,5 до 8,8.

В некоторых вариантах осуществления pH среды может составлять по меньшей мере 5,5. В других аспектах среда может иметь уровень pH около 5,5. В других аспектах среда может иметь уровень pH от 4 до 8. В некоторых случаях культуру поддерживают при уровне pH от 5,5 до 8. В других аспектах среда имеет уровень pH от 6 до 8. В некоторых случаях среда имеет уровень pH, который поддерживается на уровне pH от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают на уровне pH от 6,1 до 8,1. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают при уровне pH от 6,2 до 8,2. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают при уровне pH от 6,3 до 8,3. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают при уровне pH от 6,4 до 8,4. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают при уровне pH от 5,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают и/или поддерживают при уровне pH от 6,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне pH около 5,6, 5,7, 5,8 или 5,9. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне pH около 6. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне pH около 6,5. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне pH около 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне pH около 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0. В некоторых вариантах осуществления дрожжи выращивают при уровне выше 8.

В некоторых вариантах осуществления pH среды может находиться в диапазоне от 2 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления pH составляет около 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4,

4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7 или 8,8.

Примеры способов культивирования дрожжей можно найти в патенте США № 5436136, с названием «Repressible yeast promoters» (подан 20.12.1991; правообладатель Ciba-Geigy Corporation); патенте США № 6645739, с названием «Yeast expression systems, methods of producing polypeptides in yeast, and compositions relating to same» (подан 26.07.2001; правообладатель Phoenix Pharmacologies, Inc., Лексингтон, Кентукки) и патенте США № 10023836, с названием «Medium for yeasts» (подан 23 августа 2013 г.; правообладатель Yamaguchi University); содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ферментация

Настоящее изобретение рассматривает культуру организмов-хозяев в любом формате ферментации. Например, в данном документе могут быть использованы периодический, периодический с подпиткой, полунепрерывный и непрерывный режимы ферментации.

Ферментацию можно проводить в любом масштабе. Способы и техники, рассматриваемые в соответствии с настоящим изобретением, применимы для экспрессии рекомбинантного белка в любом масштабе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, например, можно использовать объемы ферментации в микролитрах, миллилитрах, сантилитрах и децилитрах, а также можно использовать объемы ферментации в масштабе 1 литр и более.

В некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет примерно 1 литр или превышает его. Например, в некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет от около 1 литра до около 100 литров. В некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет около 1 литр, около 2 литра, около 3 литра, около 4 литра, около 5 литров, около 6 литров, около 7 литров, около 8 литров, около 9 литров или около 10 литров. В некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет от около 1 литра до около 5 литров, от около 1 литра до около 10 литров, от около 1 литра до около 25 литров, от около 1 литра до около 50 литров, от около 1 литра до около 75 литров, от около 10 литров до около 25 литров, от около 25 литров до около 50 литров или от около 50 литров до около 100 литров. В других вариантах осуществления объем ферментации составляет или превышает 5 литров, 10 литров, 15 литров, 20 литров, 25 литров, 50 литров, 75 литров, 100 литров, 200 литров, 500 литров, 1000 литров, 2000 литров, 5000 литров, 10000 литров или 50000 литров.

В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может представлять собой питательный раствор, используемый для выращивания и/или поддержания клеток. Без ограничений этот раствор обычно предоставляет по меньшей мере один компонент из одной или нескольких из следующих категорий: (1) источник энергии, обычно в виде источника углерода, например, глюкозы, (2) все незаменимые аминокислоты и обычно

основной набор из двадцати аминокислот, (3) витамины и/или другие органические соединения, необходимые в низких концентрациях, (4) свободные жирные кислоты или липиды, например, линолевую кислоту и (5) микроэлементы, при этом микроэлементы определяются как неорганические соединения или встречающиеся в природе элементы, которые обычно требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может быть такой же, как среда для культивирования клеток или любая другая среда, описанная в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может отличаться от среды для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может быть модифицирована для обеспечения крупномасштабного производства белков.

В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может быть выборочно дополнена одним или несколькими компонентами из любой из следующих категорий: (1) гормоны и другие факторы роста, такие как сыворотка, инсулин, трансферрин и т.п.; (2) соли, например, магния, кальция и фосфата; (3) буферы, такие как HEPES; (4) нуклеозиды и основания, такие как аденозин, тимидин и т.д.; (5) белковые и тканевые гидролизаты, например пептон или смеси пептонов, которые могут быть получены из очищенного желатина, растительного материала или побочных продуктов животного происхождения; (6) антибиотики, такие как гентамицин и (7) агенты для защиты клеток, например плюроник полиол.

В некоторых вариантах осуществления pH среды для ферментации можно поддерживать с использованием pH-буферов и способов, известных специалистам в данной области техники. Контроль pH во время ферментации также может быть достигнут с помощью водного раствора аммиака. В некоторых вариантах осуществления pH среды для ферментации выбирают на основе предпочтительного pH используемого организма. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления и в зависимости от клетки-хозяина и температуры pH может находиться в диапазоне от около 1 до около 10.

В некоторых вариантах осуществления pH среды для ферментации может находиться в диапазоне от 2 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления pH составляет около 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7 или 8,8.

В других вариантах осуществления pH составляет около от 5,7 до 5,9, от 5,8 до 6,0, от 5,9 до 6,1, от 6,0 до 6,2, от 6,1 до 6,3, от 6,2 до 6,5, от 6,4 до 6,7, от 6,5 до 6,8, от 6,6 до 6,9, от 6,7 до 7,0, от 6,8 до 7,1, от 6,9 до 7,2, от 7,0 до 7,3, от 7,1 до 7,4, от 7,2 до 7,5, от 7,3 до 7,6, от 7,4 до 7,7, от 7,5 до 7,8, от 7,6 до 7,9, от 7,7 до 8,0, от 7,8 до 8,1, от 7,9 до 8,2, от 8,0 до 8,3, от 8,1 до 8,4, от 8,2 до 8,5, от 8,3 до 8,6, от 8,4 до 8,7 или от 8,5 до 8,8.

В некоторых вариантах осуществления, например, при использовании Escherichia coli (E. coli), оптимальный диапазон pH составляет от 6,5 до 7,5 в зависимости от

температуры.

В других вариантах осуществления, например, когда используется штамм дрожжей, pH может находиться в диапазоне от около 4,0 до 8,0.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать нейтральный pH, т.е. pH около 7,0.

Специалистам в данной области известно, что во время ферментации уровни pH могут меняться в результате превращения и образования субстратов и метаболических соединений.

В некоторых вариантах осуществления среда для ферментации может быть дополнена буфером или другим химическим веществом, чтобы избежать изменения pH. Например, в некоторых вариантах осуществления в среду для ферментации можно добавлять $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$, NaOH или NH_4OH, чтобы нейтрализовать образование кислых соединений, которое происходит, например, у некоторых видов дрожжей во время промышленных процессов.

Температура является еще одним важным фактором в процессе ферментации; и, как и в случае с pH, температура будет зависеть от типа выбранной клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления температуру ферментации поддерживают на уровне от около 4°C до около 42°C. В некоторых вариантах осуществления температура ферментации составляет около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C, около 8°C, около 9°C, около 10°C, около 11°C, около 12°C, около 13°C, около 14°C, около 15°C, около 16°C, около 17°C, около 18°C, около 19°C, около 20°C, около 21°C, около 22°C, около 23°C, около 24°C, около 25°C, около 26°C, около 27°C, около 28°C, около 29°C, около 30°C, около 31°C, около 32°C, около 33°C, около 34°C, около 35°C, около 36°C, около 37°C, около 38°C, около 39°C, около 40°C, около 41°C или около 42°C.

В других вариантах осуществления температуру ферментации поддерживают на уровне от около 25°C до около 27°C, от около 25°C до около 28°C, от около 25°C до около 29°C, от около 25°C до около 30°C, от около 25°C до около 31°C, от около 25°C до около 32°C, от около 25°C до около 33°C, от около 26°C до около 28°C, от около 26°C до около 29°C, от около 26°C до около 30°C, от около 26°C до около 31°C, от около 26°C до около 32°C, от около 27°C до около 29°C, от около 27°C до около 30°C, от около 27°C до около 31°C, от около 27°C до около 32°C, от около 26°C до около 33°C, от около 28°C до около 30°C, от около 28°C до около 31°C, от около 28°C до около 32°C, от около 29°C до около 31°C, от около 29°C до около 32°C, от около 29°C до около 33°C, от около 30°C до около 32°C, от около 30°C до около 33°C, от около 31°C до около 33°C, от около 31°C до около 32°C, от около 30°C до около 33°C или от около 32°C до около 33°C.

В других вариантах осуществления температура изменяется во время ферментации, например, в зависимости от стадии ферментации.

Ферментация может быть достигнута с помощью различных микроорганизмов, известных специалистам в данной области техники. Подходящие микроорганизмы для крупномасштабного производства TVP или TVP-инсектицидного белка включают любые

перечисленные в данном документе микроорганизмы. В некоторых вариантах осуществления неограничивающие примеры микроорганизмов включают штаммы рода Saccharomyces spp. (включая, помимо прочего, S. cerevisiae (пекарские дрожжи), S. distaticus, S. uvarum), рода Kluyveromyces, (включая, помимо прочего, K. marxianus, K. fragilis), рода Candida (включая, помимо прочего, C. Pseudotropicalis и C. brassicae), Pichia stipitis (родственный Candida shehatae), рода Clavispora (включая, помимо прочего, C. lusitaniae и C. opuntiae), рода Pachysolen (включая, помимо прочего, P. tannophilus), рода Bretannomyces (включая, помимо прочего, например, B. clausenii. Другие подходящие микроорганизмы включают, например, Zymomonas mobilis, Clostridium spp. (включая, помимо прочего, C. thermocellum; C. saccharobutylacetonicum, C. saccharobutylicum, C. Puniceum, C. beijernckii, и C. acetobutylicum), Moniliella pollinis, Moniliella megachiliensis, Lactobacillus spp. Yarrowia lipolytica, Aureobasidium sp., Trichosporonoides sp., Trigonopsis variabilis, Trichosporon sp., Moniliellaacetoabutans sp., Typhula variabilis, Candida magnolias, Ustilaginomycetes sp., Pseudozyma tsukubaensis, виды дрожжей родов Zygosaccharomyces, Debaryomyces, Hansenula и Pichia, и грибы рода дематиоидных Torula. *См., например.*, Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212.

Среда для ферментации может быть выбрана в зависимости от клетки-хозяина и/или потребностей конечного пользователя. Любые необходимые добавки, помимо, например, углерода, также могут быть включены в соответствующих концентрациях, вводимых отдельно или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота.

Ферментация дрожжами

Способы ферментации с использованием дрожжей хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления периодическую ферментацию можно использовать в соответствии со способами, представленными в настоящем документе; в других вариантах осуществления можно использовать процедуры непрерывной ферментации.

В некоторых вариантах осуществления для получения TVP по настоящему изобретению можно использовать периодический способ ферментации. Вкратце, периодический способ ферментации относится к типу ферментации, проводимой в закрытой системе, в которой состав среды определяется в начале ферментации и не подвергается искусственным изменениям во время ферментации (т. е. среду инокулируют одной или несколькими дрожжевыми клетками в начале ферментации, и ферментация может продолжаться без прерывания пользователем). Как правило, в системах периодической ферментации составы метаболитов и биомассы в системе постоянно изменяются до момента остановки ферментации. В периодических культурах дрожжевые клетки проходят через статическую лаг-фазу в логарифмическую фазу ускоренного роста и, наконец, в стационарную фазу, в которой скорость роста снижается или прекращается.

Без обработки дрожжевые клетки в стационарной фазе в конечном итоге погибнут. В периодическом способе дрожжевые клетки в логарифмической фазе обычно ответственны за большую часть синтеза конечного продукта.

В некоторых вариантах осуществления для получения TVP по настоящему изобретению можно использовать периодическую ферментацию с подпиткой. Вкратце, периодическая ферментация с подпиткой аналогична типичному периодическому способу (описанному выше), однако субстрат в периодическом способе с подпиткой добавляют постепенно по мере прохождения ферментации. Периодическая ферментация с подпиткой применима, когда катаболитная репрессия может ингибировать метаболизм дрожжевых клеток и когда желательно иметь ограниченное количество субстрата в среде. Как правило, измерение концентрации субстрата в периодической системе с подпиткой оценивают на основе изменений измеряемых факторов, отражающих метаболизм, таких как pH, растворенный кислород, парциальное давление отходящих газов (например, CO_2) и т.п.

В некоторых вариантах осуществления процедура периодической ферментации с подпиткой может использоваться для получения TVP следующим образом: культивирование организма-продуцента (например, модифицированной дрожжевой клетки) в 10-литровом биореакторе, барботируемом смесью N_2/CO_2 , с использованием 5 литров бульона, содержащего 5 г/л фосфата калия, 2,5 г/л хлорида аммония, 0,5 г/л сульфата магния и 30 г/л кукурузного экстракта, а начальная концентрация первого и второго источника углерода составляет 20 г/л. По мере того, как модифицированные дрожжевые клетки растут и используют источники углерода, в биореактор затем подают дополнительную смесь с 70% источника углерода со скоростью, приблизительно уравновешивающей потребление источника углерода. Температуру биореактора обычно поддерживают на уровне 30°C. Рост продолжается в течение около 24 часов или более, и гетерологичные пептиды достигают желаемой концентрации, например, при плотности клеток около от 5 до 10 г/л. По завершении периода культивирования содержимое ферментера может быть пропущено через устройство для разделения клеток, такое как центрифуга, для удаления клеток и клеточного дебриса, а ферментационный бульон может быть перенесен в устройство для разделения продуктов. Выделение гетерологичных пептидов можно проводить стандартными методами разделения, хорошо известными в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления для получения TVP по настоящему изобретению можно использовать непрерывную ферментацию. Вкратце, непрерывная ферментация относится к ферментации с открытой системой, при которой среду для ферментации непрерывно добавляют в биореактор, и одновременно удаляют примерно равное количество кондиционированной среды для обработки. Непрерывная ферментация обычно поддерживает высокую плотность культур, при которой дрожжевые клетки в основном находятся в логарифмической фазе роста. Как правило, способы непрерывной ферментации применяют для поддержания стабильных условий роста, и потеря

дрожжевых клеток из-за удаления среды должна быть сбалансирована со скоростью роста клеток в процессе ферментации.

В некоторых вариантах осуществления способ непрерывной ферментации можно использовать для получения TVP следующим образом: модифицированный штамм дрожжей можно культивировать с использованием биореактора и состава среды, хотя при этом исходные первый и второй источники углерода составляют около, например, 30-50 г/л. Когда источник углерода истощается, исходная среда того же состава непрерывно подается со скоростью около от 0,5 л/ч до 1 л/ч, и жидкость отводится с той же скоростью. Концентрация гетерологичного пептида в биореакторе обычно остается постоянной наряду с плотностью клеток. Температуру обычно поддерживают на уровне 30°C, а pH обычно поддерживают на уровне около 4,5 с использованием, при необходимости, концентрированного NaOH и HCl.

В некоторых вариантах осуществления при получении TVP биореактор может работать непрерывно, например, в течение примерно одного месяца, при этом образцы отбирают каждый день или по мере необходимости для обеспечения постоянства концентрации целевого химического соединения. В непрерывном режиме содержимое ферментера постоянно удаляют по мере подачи новой питательной среды. Выходящий поток, содержащий клетки, среду и гетерологичные пептиды, затем может быть подвергнут процедуре непрерывного разделения продуктов с удалением или без удаления клеток и клеточного дебриса, и может быть выполнен с помощью методов непрерывного разделения, хорошо известных в данной области техники, для отделения органических продуктов от представляющих интерес пептидов.

В некоторых вариантах осуществления дрожжевую клетку, способную экспрессировать TVP или TVP-инсектицидный белок, можно выращивать, например, с использованием периодического процесса с подпиткой в аэробном биореакторе. Вкратце, реакторы заполняют на около 20-70% объема средой, содержащей источник углерода и другие реагенты. Температуру и pH поддерживают с использованием одного или нескольких химических веществ, как описано в данном документе. Уровень кислорода поддерживают периодическим барботажем воздуха при перемешивании.

Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ использования периодического процесса с подпиткой в аэробном биореакторе, при котором реактор заполнен на около 20%; 21%; 22%; 23%; 24%; 25%; 26%; 27%; 28%; 29%; 30%; 31%; 32%; 33%; 34%; 35%; 36%; 37%; 38%; 39%; 40%; 41%; 42%; 43%; 44%; 45%; 46%; 47%; 48%; 49%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; или 70% объема.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ периодической ферментации с подпиткой с использованием аэробного биореактора для получения TVP, при этом среда представляет собой богатую питательную среду. Например, в некоторых вариантах осуществления источником углерода может быть глюкоза, сорбит или лактоза.

В некоторых вариантах осуществления количество глюкозы может составлять около 2 г/л; 3 г/л; 4 г/л; 5 г/л; 6 г/л; 7 г/л; 8 г/л; 9 г/л; 10 г/л; 11 г/л; 12 г/л; 13 г/л; 14 г/л; 15 г/л; 16 г/л; 17 г/л; 18 г/л; 19 г/л; 20 г/л; 21 г/л; 22 г/л; 23 г/л; 24 г/л; 25 г/л; 26 г/л; 27 г/л; 28 г/л; 29 г/л; или 30 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления количество сорбита может составлять около 2 г/л; 3 г/л; 4 г/л; 5 г/л; 6 г/л; 7 г/л; 8 г/л; 9 г/л; 10 г/л; 11 г/л; 12 г/л; 13 г/л; 14 г/л; 15 г/л; 16 г/л; 17 г/л; 18 г/л; 19 г/л; 20 г/л; 21 г/л; 22 г/л; 23 г/л; 24 г/л; 25 г/л; 26 г/л; 27 г/л; 28 г/л; 29 г/л; или 30 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления количество лактозы может составлять около 2 г/л; 3 г/л; 4 г/л; 5 г/л; 6 г/л; 7 г/л; 8 г/л; 9 г/л; 10 г/л; 11 г/л; 12 г/л; 13 г/л; 14 г/л; 15 г/л; 16 г/л; 17 г/л; 18 г/л; 19 г/л; 20 г/л; 21 г/л; 22 г/л; 23 г/л; 24 г/л; 25 г/л; 26 г/л; 27 г/л; 28 г/л; 29 г/л; или 30 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ периодической ферментации с подпиткой с использованием аэробного биореактора, при этом в среду добавляют одно или несколько из фосфорной кислоты, сульфата кальция, сульфата калия, гептагидрата сульфата магния, гидроксида калия и/или кукурузного экстракта.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлена фосфорная кислота в количестве около 2 г/л; 3 г/л; 4 г/л; 5 г/л; 6 г/л; 7 г/л; 8 г/л; 9 г/л; 10 г/л; 11 г/л; 12 г/л; 13 г/л; 14 г/л; 15 г/л; 16 г/л; 17 г/л; 18 г/л; 19 г/л; 20 г/л; 21 г/л; 22 г/л; 23 г/л; 24 г/л; 25 г/л; 26 г/л; 27 г/л; 28 г/л; 29 г/л; или 30 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлен сульфат кальция в количестве около 0,05 г/л; 0,15 г/л; 0,25 г/л; 0,35 г/л; 0,45 г/л; 0,55 г/л; 0,65 г/л; 0,75 г/л; 0,85 г/л; 0,95 г/л; 1,05 г/л; 1,15 г/л; 1,25 г/л; 1,35 г/л; 1,45 г/л; 1,55 г/л; 1,65 г/л; 1,75 г/л; 1,85 г/л; 1,95 г/л; 2,05 г/л; 2,15 г/л; 2,25 г/л; 2,35 г/л; 2,45 г/л; 2,55 г/л; 2,65 г/л; 2,75 г/л; 2,85 г/л; или 2,95 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлен сульфат калия в количестве около 2 г/л; 2,5 г/л; 3 г/л; 3,5 г/л; 4 г/л; 4,5 г/л; 5 г/л; 5,5 г/л; 6 г/л; 6,5 г/л; 7 г/л; 7,5 г/л; 8 г/л; 8,5 г/л; 9 г/л; 9,5 г/л; 10 г/л; 10,5 г/л; 11 г/л; 11,5 г/л; 12 г/л; 12,5 г/л; 13 г/л; 13,5 г/л; 14 г/л; 14,5 г/л; 15 г/л; 15,5 г/л; 16 г/л; 16,5 г/л; 17 г/л; 17,5 г/л; 18 г/л; 18,5 г/л; 19 г/л; 19,5 г/л; или 20 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлен гептагидрат сульфата магния в количестве около 0,25 г/л; 0,5 г/л; 0,75 г/л; 1 г/л; 1,25 г/л; 1,5 г/л; 1,75 г/л; 2 г/л; 2,25 г/л; 2,5 г/л; 2,75 г/л; 3 г/л; 3,25 г/л; 3,5 г/л; 3,75 г/л; 4 г/л; 4,25 г/л; 4,5 г/л; 4,75 г/л; 5 г/л; 5,25 г/л; 5,5 г/л; 5,75 г/л; 6 г/л; 6,25 г/л; 6,5 г/л; 6,75 г/л; 7 г/л; 7,25 г/л; 7,5 г/л; 7,75 г/л; 8 г/л; 8,25 г/л; 8,5 г/л; 8,75 г/л; 9 г/л; 9,25 г/л; 9,5 г/л; 9,75 г/л; 10 г/л; 10,25 г/л; 10,5 г/л; 10,75 г/л; 11 г/л; 11,25 г/л; 11,5 г/л; 11,75 г/л; 12 г/л; 12,25 г/л; 12,5 г/л; 12,75 г/л; 13 г/л; 13,25 г/л; 13,5 г/л; 13,75 г/л; 14 г/л; 14,25 г/л; 14,5 г/л; 14,75 г/л; или 15 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлен гидроксид калия в количестве около 0,25 г/л; 0,5 г/л; 0,75 г/л; 1 г/л; 1,25 г/л; 1,5 г/л; 1,75 г/л; 2 г/л;

2,25 г/л; 2,5 г/л; 2,75 г/л; 3 г/л; 3,25 г/л; 3,5 г/л; 3,75 г/л; 4 г/л; 4,25 г/л; 4,5 г/л; 4,75 г/л; 5 г/л; 5,25 г/л; 5,5 г/л; 5,75 г/л; 6 г/л; 6,25 г/л; 6,5 г/л; 6,75 г/л; или 7 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления в среду может быть добавлен кукурузный экстракт в количестве около 5 г/л; 6 г/л; 7 г/л; 8 г/л; 9 г/л; 10 г/л; 11 г/л; 12 г/л; 13 г/л; 14 г/л; 15 г/л; 16 г/л; 17 г/л; 18 г/л; 19 г/л; 20 г/л; 21 г/л; 22 г/л; 23 г/л; 24 г/л; 25 г/л; 26 г/л; 27 г/л; 28 г/л; 29 г/л; 30 г/л; 31 г/л; 32 г/л; 33 г/л; 34 г/л; 35 г/л; 36 г/л; 37 г/л; 38 г/л; 39 г/л; 40 г/л; 41 г/л; 42 г/л; 43 г/л; 44 г/л; 45 г/л; 46 г/л; 47 г/л; 48 г/л; 49 г/л; 50 г/л; 51 г/л; 52 г/л; 53 г/л; 54 г/л; 55 г/л; 56 г/л; 57 г/л; 58 г/л; 59 г/л; 60 г/л; 61 г/л; 62 г/л; 63 г/л; 64 г/л; 65 г/л; 66 г/л; 67 г/л; 68 г/л; 69 г/л; или 70 г/л среды.

В некоторых вариантах осуществления температуру реактора можно поддерживать в пределах от около 15°C до около 45°C. В некоторых вариантах осуществления реактор может иметь температуру около 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C или 40°C.

В некоторых вариантах осуществления pH может иметь уровень от около 3 до около 6. В некоторых вариантах осуществления pH может составлять 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0.

В некоторых вариантах осуществления pH можно поддерживать на постоянном уровне путем добавления одного или нескольких химических веществ. Например, в некоторых вариантах осуществления для поддержания pH может быть добавлен гидроксид аммония. В некоторых вариантах осуществления гидроксид аммония можно добавлять до уровня гидроксида аммония в среде, который составляет около 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% гидроксида аммония

В некоторых вариантах осуществления уровни кислорода можно поддерживать барботированием. Например, в некоторых вариантах осуществления растворенный кислород можно поддерживать на постоянном уровне путем барботирования воздуха в диапазоне 0,5-1,5 об./об./мин. и путем усиления перемешивания для поддержания заданного значения 10-30%.

В некоторых вариантах осуществления инокуляцию реактора можно осуществить на основе ночной посевной культуры, содержащей от около 2,5 г/л до около 50 г/л источника углерода, например, глюкозы, сорбита или лактозы. В некоторых вариантах осуществления ночная посевная культура может содержать кукурузный экстракт, например, от около 2,5 г/л до около 50 г/л кукурузного экстракта.

В некоторых вариантах осуществления процент инокуляции может варьироваться около 5-20% от начального объема заполнения. После инокуляции в реактор можно подавать от около 50% до около 80% раствора выбранного источника углерода до тех пор, пока реактор не будет заполнен и/или не будет достигнута желаемая концентрация пептида в супернатанте. В некоторых вариантах осуществления время, необходимое для заполнения реактора, может варьироваться от около 86 часов до около 160 часов. В

некоторых вариантах осуществления количество, необходимое для достижения желаемой концентрации пептида, может составлять от около 0,8 г/л до около 1,2 г/л. По завершении ферментации содержимое может быть пропущено через устройство для разделения клеток и, возможно, сконцентрировано, в зависимости от предполагаемого использования материала.

Дополнительные рецептуры среды для ферментации дрожжами приведены в данном документе.

Рецептуры сред и исходных растворов для ферментации для дрожжевых клеток описаны следующим образом: (1) рецептура среды MSM: 2 г/л дигидрата цитрата натрия; 1 г/л дигидрата сульфата кальция (0,79 г/л безводного сульфата кальция); 42,9 г/л одноосновного фосфата калия; 5,17 г/л сульфата аммония; 14,33 г/л сульфата калия; 11,7 г/л гептагидрата сульфата магния; 2 мл/л раствора солей микроэлементов PTM1; 0,4 частей на миллион биотина (из 500X, 200 частей на миллион исходного раствора); 1-2% чистого глицерина или другого источника углерода. (2) раствор солей микроэлементов PTM1: сульфат меди-5H2O 6,0 г; йодид натрия 0,08 г; сульфат марганца-H2O 3,0 г; молибдат натрия-2H_2O 0,2 г; борная кислота 0,02 г; хлорид кобальта 0,5 г; хлорид цинка 20,0 г; сульфат железа-7H_2O 65,0 г; биотин 0,2 г; серная кислота 5,0 мл; добавить воды до конечного объема 1 литр. Иллюстративный состав среды для определения K. lactis (DMSor) следующий: 11,83 г/л KH_2PO_4, 2,299 г/л K_2HPO_4, 20 г/л ферментируемого сахара, например, галактозы, мальтозы, латотриозы, сахарозы, фруктозы или глюкозы, и/или сахарного спирта, например, эритрита, гидрированных гидролизатов крахмала, изомальта, лактита, мальтита, маннита и ксилита, 1 г/л $MgSO_4.7H_2O$, 10 г/л $(NH_4)SO_4$, 0,33 г/л $CaCl_2.2H_2O$, 1 г/л NaCl, 1 г/л KCl, 5 мг/л $CuSO_4.5H_2O$, 30 мг/л $MnSO_4.H_2O$, 10 мг/л $ZnCl_2$, 1 мг/л KI, 2 мг/л $CoCl_2.6H_2O$, 8 мг/л $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0,4 мг/л H_3BO_3, 15 мг/л $FeCl_3.6H_2O$, 0,8 мг/л биотина, 20 мг/л Ca-пантотената, 15 мг/л тиамина, 16 мг/л мио-инозитола, 10 мг/л никотиновой кислоты и 4 мг/л пиридоксина.

Деградация пептидов

Белки, полипептиды и пептиды деградируют как в биологических образцах, так и в растворе (например, в клеточной культуре и/или во время ферментации). Способы обнаружения деградации пептида TVP хорошо известны в данной области техники. В данном документе можно использовать любой из известных способов обнаружения деградации пептида (например, во время ферментации).

В некоторых вариантах осуществления деградацию пептида можно обнаружить с помощью методов мечения изотопов; жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС); ВЭЖХ; включения радиоактивных аминокислот и последующего обнаружения, например, посредством сцинтилляционного счета; использования репортерного белка, например, белка, который можно обнаружить (например, с помощью флуоресценции, спектроскопии, люминометрии и т. д.); интенсивности флуоресценции одного или нескольких биолюминесцентных белков и/или флуоресцентных белков и/или их слияний; импульсного анализа (например, импульсное мечение клетки радиоактивными

аминокислотами и отслеживание распада меченого белка при погоне за немеченым предшественником, а также остановка синтеза белка и измерение снижения общего уровня белка с течением времени); циклогексимид-чейз анализов;

В некоторых вариантах осуществления для обнаружения деградации пептида можно использовать анализ, при котором образец контактирует с нефлуоресцентным соединением, способным реагировать со свободным первичным амином в указанном образце, полученным в результате деградации пептида, и который затем производит флуоресцентный сигнал, который можно количественно определить и сравнить со стандартом. Примерами нефлуоресцентных соединений, которые можно использовать в качестве флуоресцентных меток для свободных аминов в соответствии с настоящим изобретением, являются 3-(4-карбоксибензоил)хинолин-2-карбоксальдегид (CBQCA), флуорескамин и о-фталдиальдегид.

В некоторых вариантах осуществления способ определения считываемого сигнала репортерного белка зависит от природы репортерного белка. Например, для флуоресцентных репортерных белков считываемый сигнал соответствует интенсивности флуоресцентного сигнала. Считываемый сигнал может быть измерен с использованием, например, способов и систем обнаружения, основанных на спектроскопии, флуорометрии, фотометрии и/или люминометрии. Такие способы и системы обнаружения хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления для обнаружения деградации пептида можно использовать стандартные иммунологические процедуры, известные специалистам в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления деградация пептида может быть обнаружена в образце с помощью иммунологических анализов, в которых используется обнаруживаемое антитело. Такие иммунологические анализы включают, например, анализы агглютинации, ИФА, микрофлуориметрический анализ Pandex, проточную цитометрию, диагностические анализы сыворотки и процедуры иммуногистохимического окрашивания, все из которых хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровни (например, флуоресценции) в одном образце можно сравнить со стандартом. Антитело можно сделать обнаруживаемым различными способами, хорошо известными в данной области техники. Например, обнаруживаемый маркер может быть прямо или косвенно присоединен к антителу. Пригодные маркеры включают, например, радионуклеотиды, ферменты, флуорогены, хромогены и хемилюминесцентные метки.

Примеры способов обнаружения деградации пептидов представлены в патентах США № 5766927; 7504253; 9201073; 9429566; патентной заявке США 20120028286; Eldeeb et al., A molecular toolbox for studying protein degradation in mammalian cells. J Neurochem. 2019 Nov;151(4):520-533 и Buchanan et al., Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in Saccharomyces cerevisiae. J Vis Exp. 2016; (110): 53975, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтически приемлемые соли

Используемые в данном документе термины «фармацевтически приемлемая соль» и «сельскохозяйственно приемлемая соль» являются синонимами. В некоторых вариантах осуществления можно использовать фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, кристаллические формы и отдельные изомеры, энантиомеры, таутомеры, диастереомеры и пролекарства TVP, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению обладает желаемой фармакологической активностью исходного соединения. Такие соли включают: соли присоединения кислот, образованные неорганическими кислотами; соли присоединения кислот, образованные органическими кислотами; или соли, образованные при замещении кислотного протона, присутствующего в исходном соединении, ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом алюминия; при координации кислотного протона с органическим основанием, таким как этаноламин и т.п.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают обычные токсичные или нетоксичные соли. Например, в некоторых вариантах осуществления обычные нетоксичные соли включают такие соли, как фумарат, фосфат, цитрат, хлоргидрат и т.п. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения обычными химическими способами. В некоторых вариантах осуществления такие соли могут быть получены реакцией свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси. В некоторых вариантах осуществления предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль может быть одной из следующих: гидрохлоридной; натриевой; сульфатной; ацетатной; фосфатной или дифосфатной; хлоридной; калиевой; малеатной; кальциевой; цитратной; мезилатной; нитратной; тартратной; алюминиевой или глюконатной.

В некоторых вариантах осуществления список фармацевтически приемлемых кислот, которые можно использовать для образования солей, может включать: гликолевую кислоту; гиппуровую кислоту; бромистоводородную кислоту; соляную кислоту; изомасляную кислоту; молочную кислоту (DL); лактобионовую кислоту; лауриновую кислоту; малеиновую кислоту; яблочную кислоту (- L); малоновую кислоту; миндальную кислоту (DL); метансульфоновую кислоту; нафталин-1,5-дисульфокислоту; нафталин-2-сульфокислоту; никотиновую кислоту; азотную кислоту; олеиновую кислоту; щавелевую кислоту; пальмитиновую кислоту; памовую кислоту; фосфорную кислоту; пропионовую кислоту; пироглутаминовую кислоту (- L); салициловую кислоту; себациновую кислоту; стеариновую кислоту; янтарную кислоту; серную кислоту; винную

кислоту (+ L); тиоциановую кислоту; толуолсульфокислоту (*p*); ундециленовую кислоту; 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту; 2,2-дихлоруксусную кислоту; 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту; 2-оксоглутаровую кислоту; 4-ацетамидобензойную кислоту; 4-аминосалициловую кислоту; уксусную кислоту; адипиновую кислоту; аскорбиновую кислоту (L); аспарагиновую кислоту (L); бензолсульфоновую кислоту; бензойную кислоту; камфорную кислоту (+); камфор-10-сульфокислоту (+); каприновую кислоту (декановую кислоту); капроновую кислоту (гексановую кислоту); каприловую кислоту (октановую кислоту); угольную кислоту; коричную кислоту; лимонную кислоту; цикламовую кислоту; додецилсерную кислоту; этан-1,2-дисульфокислоту; этансульфоновую кислоту; муравьиную кислоту; фумаровую кислоту; галактаровую кислоту; гентизиновую кислоту; глюкогептоновую кислоту (D); глюконовую кислоту (D); глюкуроновую кислоту (D); глютаминовую кислоту; глутаровую кислоту или глицерофосфорную кислоту.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль может представлять собой любую органическую или неорганическую соль присоединения кислоты.

В некоторых вариантах осуществления соль может использовать неорганическую кислоту и органическую кислоту в качестве свободной кислоты. Неорганической кислотой может быть соляная кислота, бромная кислота, азотная кислота, серная кислота, хлорная кислота, фосфорная кислота и т.д. Органическая кислота может представлять собой лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, метансульфокислоту, глюконовую кислоту, янтарную кислоту, винную кислоту, галактуроновую кислоту, эмбоновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, щавелевую кислоту, (D) или (L) яблочную кислоту, малеиновую кислоту, метансульфокислоту, этансульфоновую кислоту, 4-толуолсульфокислоту, салициловую кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту и др.

В некоторых вариантах осуществления соли включают соли щелочных металлов (соли натрия, соли калия и т.д.) и соли щелочноземельных металлов (соли кальция, соли магния и т.д.). Например, соль присоединения кислоты может включать ацетат, аспартат, бензоат, безилат, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, борат, камзилат, цитрат, эдисилат, эзилат, формиат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/хлорид, гидробромид/бромид, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафталат, 2-напсилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, сахарат, стеарат, сукцинат, тартрат, тозилат, трифторацетат, алюминий, аргинин, бензатин, кальций, холин, диэтиламин, диоламин, глицин, лизин, магний, меглюмин, оламин, калий, натрий, трометамин, соль цинка и т. д., и среди них можно использовать гидрохлорид или трифторацетат.

В других вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль может

представлять собой соль кислоты, такой как уксусная кислота, пропионовая кислота, масляная кислота, муравьиная кислота, трифторуксусная кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, этилянтарная кислота, лактобионовая кислота, глюконовая кислота, глюкогептоновая кислота, бензойная кислота, метансульфокислота, этансульфокислота, 2-гидроксиэтансульфокислота, бензолсульфокислота, п-толуолсульфокислота, лаурилсерная кислота, яблочная кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, адипиновая кислота, цистеин, N-ацетилцистеин, соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота, йодистоводородная кислота, никотиновая кислота, щавелевая кислота, пикриновая кислота, тиоциановая кислота, ундекановая кислота, полиакрилат или карбоксивиниловый полимер.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль может быть получена либо из неорганических, либо из органических оснований. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, помимо прочего, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия, железа, марганца и т.п. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония, натрия, калия, кальция и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, помимо прочего, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, и циклические амины, включая изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диметиламиноэтанол, трометамин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, новокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, N-алкилглюкамины, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин и т.п. Предпочтительными органическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, пиперидин, трометамин и холин.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль относится к тем солям, которые в рамках обоснованного медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., и соизмеримы с обоснованным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S. M. Berge, et al. describe pharmaceutically acceptable salts in detail in J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления соли по настоящему изобретению могут быть получены in situ во время окончательного выделения и очистки соединений по настоящему изобретению или отдельно путем взаимодействия функциональной группы свободного основания с подходящей органической кислотой. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей присоединения кислот являются соли аминогруппы, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или

органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, используемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валератные соли и т.п. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

Примеры описаний фармацевтически приемлемых солей приведены в P. H. Stahl and C. G. Wermuth, (editors), Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, John Wiley & Sons, Aug 23, (2002), содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ВВЕДЕНИЕ TVP В РАСТЕНИЯ ИЛИ ИХ ЧАСТИ

TVP, описанные в настоящем документе, и/или инсектицидный белок, состоящий из одного или нескольких TVP, описанных в настоящем документе, могут быть введены в растения, ткани растений, клетки растений, семена растений и/или их части растений либо для стабильной, либо для временной экспрессии TVP или TVP-инсектицидного белка и/или кодирующей их полинуклеотидной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления TVP (или инсектицидный белок, состоящий из одного или нескольких TVP) можно вводить в растение с использованием рекомбинантных методов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления TVP или инсектицидный белок, состоящий из одного или нескольких TVP, может быть в форме инсектицидного белка, который может состоять из одного или нескольких мономеров TVP.

Используемый в данном документе в отношении трансгенных растений, тканей растений, клеток растений и семян растений термин «TVP» также включает TVP-инсектицидный белок, а «полинуклеотид TVP» аналогичным образом также используется для охвата полинуклеотида или группы полинуклеотидов, способных экспрессировать и/или кодировать инсектицидный белок, состоящий из одного или нескольких TVP.

Цель включения TVP в растения (т. е. получение трансгенных растений, которые экспрессируют вариант полинуклеотида U1-агатоксин-Ta1b и/или инсектицидный белок

TVP) состоит в том, чтобы доставить TVP, содержащий инсектицидные белки, вредителю посредством потребления насекомым трансгенного TVP, экспрессированного в ткани растения, потребляемой насекомым. При потреблении TVP насекомым из пищи (например, посредством поедания насекомым трансгенного растения, трансформированного TVP), потребленный TVP может обладать способностью ингибировать рост, нарушать движение или даже убивать насекомое. Соответственно, трансгенные растения, экспрессирующие полинуклеотид TVP и/или полипептид TVP, могут экспрессировать указанный полинуклеотид/полипептид TVP в различных тканях растений, включая, помимо прочего: эпидермис (например, мезофилл); перидерма; флоэма; ксилема; паренхима; колленхима; склеренхима; первичные и вторичные меристематические ткани. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая TVP, может быть функционально связана с регуляторной областью, содержащей промотор фосфоенолпируваткарбоксилазы, что приводит к экспрессии TVP в ткани мезофилла растения.

Трансгенные растения, экспрессирующие TVP и/или полинуклеотид, способный экспрессировать TVP, могут быть получены любым из различных способов и протоколов, хорошо известных специалистам в данной области техники; такие способы по изобретению не требуют использования конкретного способа введения нуклеотидной конструкции в растение, а требуют только того, чтобы нуклеотидная конструкция получила доступ внутрь по меньшей мере одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструкций в растения известны в данной области техники, включая, помимо прочего, способы стабильной трансформации, способы транзиторной трансформации и вирусоопосредованные способы. «Трансгенные растения», или «трансформированные растения», или «стабильно трансформированные» растения, или клетки, или ткани относятся к растениям, в клетку которых ввели или интегрировали экзогенные последовательности нуклеиновых кислот или фрагменты ДНК. Эти последовательности нуклеиновых кислот включают те, которые являются экзогенными или не присутствуют в нетрансформированной клетке растения, а также те, которые могут быть эндогенными или присутствовать в нетрансформированной клетке растения. «Гетерологичный» обычно относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые не являются эндогенными для клетки или части нативного генома, в котором они присутствуют, и которые были добавлены в клетку путем инфекции, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции или т.п.

Трансформацию растительных клеток можно осуществить одним из нескольких способов, известных в данной области техники. Как правило, конструкция, которая экспрессирует экзогенный или гетерологичный пептид или полипептид, представляющий интерес (например, TVP), должна содержать промотор для управления транскрипцией гена, а также 3'-нетранслируемую область, обеспечивающую терминацию транскрипции и полиаденилирование. Дизайн и организация таких конструкций хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать

ген таким образом, чтобы полученный пептид секретировался или иным образом нацеливался внутри клетки растения на конкретную область и/или органеллу. Например, можно сконструировать ген так, чтобы он содержал сигнальный пептид для облегчения переноса пептида в эндоплазматический ретикулум. Также может быть предпочтительным сконструировать кассету экспрессии растения так, чтобы она содержала интрон, так что для экспрессии требуется процессинг мРНК интрона.

Как правило, кассета экспрессии растения может быть встроена в вектор трансформации растения. Этот вектор трансформации растения может содержать один или несколько ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растения. Например, общепринятой практикой в данной области техники является использование векторов для трансформации растений, которые содержат более одного непрерывного сегмента ДНК. Эти векторы часто называют в данной области техники «бинарными векторами». Бинарные векторы, а также векторы с хелперными плазмидами чаще всего используются для опосредованной Agrobacterium трансформации, когда размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, достаточно велики, и выгодно разделить функции на отдельные молекулы ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, который содержит цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как левая граница и правая граница), селективный маркер, сконструированный таким образом, чтобы он мог экспрессироваться в растительной клетке, и «представляющий интерес ген» (ген, сконструированный таким образом, чтобы он мог экспрессироваться в клетке растения, для которой желательно создание трансгенных растений). Также в этом плазмидном векторе присутствуют последовательности, необходимые для репликации бактерий. Цис-действующие последовательности организованы таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос в клетки растения и экспрессию в них. Например, селективный маркерный ген и TVP расположены между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит трансактивные факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК от Agrobacterium в клетки растения. Эта плазмида часто содержит функции вирулентности (гены Vir), которые делают возможной инфекцию клеток растения Agrobacterium и перенос ДНК путем расщепления пограничных последовательностей и вирус-опосредованного переноса ДНК, как известно в данной области техники (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Несколько типов штаммов Agrobacterium (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т. д.) можно использовать для трансформации растений. Второй плазмидный вектор не требуется для трансформации растений другими способами, такими как микропроецирование, микроинъекция, электропорация, полиэтиленгликоль-опосредованный способ и т.д.

Как правило, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в клетки-мишени растения (например, незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т. д.) с последующим применением максимального порогового уровня соответствующего отбора

(в зависимости от селективного маркерного гена) для выделения трансформированных растительных клеток из группы нетрансформированной клеточной массы. Экспланты обычно переносят в свежую порцию той же среды и культивируют как обычно. В дальнейшем трансформированные клетки дифференцируют в побеги после помещения на среду для регенерации, дополненную максимальным пороговым уровнем селекционного агента. Затем побеги переносят в селективную среду для укоренения для восстановления укоренившихся побегов или проростков. Затем трансгенный росток вырастает в зрелое растение и дает плодородные семена (например, Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Экспланты обычно переносят в свежую порцию той же среды и культивируют как обычно. Общее описание приемов и способов получения трансгенных растений можно найти в Ayres and Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) Maydica 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит много клеток, как трансформированные, так и нетрансформированные клетки присутствуют в любом фрагменте подвергаемого воздействию целевого каллюса, ткани или группы клеток. Способность уничтожать нетрансформированные клетки и обеспечивать пролиферацию трансформированных клеток приводит к получению трансформированных культур растений. Часто возможность удаления нетрансформированных клеток является ограничением для быстрого восстановления трансформированных клеток растений и успешного получения трансгенных растений.

Протоколы трансформации, а также протоколы введения нуклеотидных последовательностей в растения могут варьироваться в зависимости от типа растения или клетки растения, т.е. однодольных или двудольных, предназначенных для трансформации. Создание трансгенных растений может быть осуществлена одним из нескольких способов, включая, помимо прочего, микроинъекцию, электропорацию, прямой перенос генов, введение гетерологичной ДНК с помощью Agrobacterium в клетки растений (Agrobacteriumo-посредованная трансформация), бомбардировку клеток растений гетерологичной чужеродной ДНК, прикрепленной к частицам, баллистическое ускорение частиц, трансформацию аэрозольным пучком, трансформацию Lec1 и различные другие способы переноса ДНК, не связанные с частицами. Примеры протоколов трансформации описаны в опубликованной заявке США № 20010026941; патенте США № 4945050; международной публикации № WO 91/00915 и опубликованной заявке США № 2002015066, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Хлоропласты также можно легко трансформировать, и способы трансформации хлоропластов известны в данной области техники. См., например, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Способ трансформации хлоропластов основан на доставке частиц ДНК, содержащей селективный маркер, и

нацеливании ДНК на геном пластид посредством гомологичной рекомбинации. Кроме того, трансформация пластид может быть осуществлена путем трансактивации молчащего переносимого пластидами трансгена посредством тканепредпочтительной экспрессии кодируемой в ядре и управляемой пластидой РНК-полимеразы. О такой системе сообщалось в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения специалист в данной области техники может затем применить максимальный пороговый уровень соответствующего селективного химического вещества/реагента (например, антибиотика) в среде для уничтожения нетрансформированных клеток, а также отделить и вырастить предположительно трансформированные клетки, которые выживают после этой селективной обработки, путем регулярного переноса указанных выживших клеток в свежую среду. Путем непрерывных пассажей и исследований с соответствующим отбором специалист в данной области техники идентифицирует и пролиферирует клетки, трансформированные плазмидным вектором. Затем можно использовать молекулярные и биохимические методы для подтверждения присутствия представляющего интерес интегрированного гетерологичного гена в геном трансгенного растения.

Клетки, которые были трансформированы, могут быть выращены в растения в соответствии с обычными способами, известными специалистам в данной области техники. См., например, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Затем эти растения можно выращивать и опылять одним и тем же трансформированным штаммом или разными штаммами, и идентифицируют полученный в результате гибрид, имеющий конститутивную экспрессию желаемого фенотипического признака. Два или более поколения могут быть выращены, чтобы гарантировать, что экспрессия желаемого фенотипического признака стабильно поддерживается и наследуется, а затем можно собрать семена, чтобы гарантировать достижение желаемого фенотипического признака. Таким образом, в настоящем изобретении предложены трансформированные семена (также называемые «трансгенными семенами»), имеющие нуклеотидную конструкцию по изобретению, например кассету экспрессии по изобретению, стабильно включенную в их геном.

В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен TVP-инсектицидный белок, который действует как субстрат для протеиназ, протеаз и пептидаз насекомых (совместно названных в настоящем документе «протеазами»), как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления трансгенные растения или их части, которые могут быть восприимчивы к экспрессии TVP, могут включать: люцерну, банан, ячмень, фасоль, брокколи, капусту, рапс, морковь, маниоку, клещевину, цветную капусту, сельдерей, нут, пекинскую капусту, цитрусовые, кокос, кофе, кукурузу, клевер, хлопок, тыкву, огурец, пихту Дугласа, баклажан, эвкалипт, лен, чеснок, виноград, хмель, лук-порей, салат, сосну Лоблолли, просо, дыни, орех, овес, оливки, лук, декоративные,

пальмовые, пастбищные травы, горох, арахис, перец, голубиный горох, сосну, картофель, тополь, тыкву, сосну лучистую, редис, рапс, рис, подвои, рожь, сафлор, кустарник, сорго, южную сосну, сою, шпинат, кабачки, клубнику, сахарную свеклу, сахарный тростник, подсолнечник, сладкую кукурузу, ликвидамбар, сладкий картофель, просо, чай, табак, томат, тритикале, газонную траву, арбуз и растение пшеницы.

В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение может быть выращено из клеток, которые первоначально были трансформированы ДНК-конструкциями, описанными в настоящем документе. В других вариантах осуществления трансгенное растение может экспрессировать кодируемый TVP в конкретной ткани или части растения, например, листе, стебле, цветке, чашелистике, плоде, корне, семени или их комбинациях.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения или семя растения могут быть трансформированы TVP или кодирующим его полинуклеотидом, при этом TVP содержит полипептид TVP с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-X_6, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; и при этом X_6 представляет собой G или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения или семя растения могут быть трансформированы TVP или кодирующим его полинуклеотидом, при этом TVP содержит полипептид TVP с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-X_6, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой G или отсутствует; и при этом , если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения или семя растения могут быть трансформированы TVP или кодирующим его полинуклеотидом, при этом TVP содержит полипептид TVP с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения или семя растения могут быть трансформированы полинуклеотидом, кодирующим TVP, при этом полинуклеотид, кодирующий TVP, или комплементарная ему нуклеотидная последовательность выбраны из группы, состоящей из SEQ NO: 2, 3, 4 , 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения или семя растения могут быть трансформированы TVP или кодирующим его полинуклеотидом, при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более полипептидов TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

Белки с расщепляемыми линкерами и нерасщепляемыми линкерами

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок содержит по меньшей мере один TVP, функционально связанный с расщепляемым пептидом. В других вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок содержит по меньшей мере один TVP, функционально связанный с нерасщепляемым пептидом.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать два или более расщепляемых пептида, при этом инсектицидный белок содержит расщепляемый насекомыми линкер (L), причем расщепляемый насекомыми линкер слит в рамке с конструкцией, содержащей $(TVP\text{-}L)_n$, где «n» представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10. В другом варианте осуществления TVP-инсектицидный белок, описанный в настоящем документе, содержит сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), функционально связанный с TVP, который функционально связан с расщепляемым насекомым линкером (L) и/или повторяющейся конструкцией $(L\text{-}TVP)_n$ или $(TVP\text{-}L)_n$, где n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10.

В различных вариантах осуществления типичный инсектицидный белок может включать белковую конструкцию, содержащую: $(ERSP)\text{-}(TVP\text{-}L)_n$; $(ERSP)\text{-}(L)\text{-}(TVP\text{-}L)_n$; $(ERSP)\text{-}(L\text{-}TVP)_n$; $(ERSP)\text{-}(L\text{-}TVP)_n\text{-}(L)$; где n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10. В различных схожих вариантах осуществления, описанных выше, TVP представляет собой вышеупомянутые варианты полипептида U1-агатоксин-Ta1b, L представляет собой нерасщепляемый или расщепляемый пептид, а n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, предпочтительно целое число в диапазоне от 1 до 100, и более предпочтительно целое число в диапазоне от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать одинаковые или разные пептиды TVP, а также одинаковые или разные расщепляемые насекомыми пептиды. В некоторых вариантах осуществления С-концевой TVP функционально связан на своем С-конце с расщепляемым пептидом, который расщепляется в кишечной среде насекомого. В некоторых вариантах осуществления N-концевой TVP функционально связан на своем N-конце с

расщепляемым пептидом, который расщепляется в кишечной среде насекомого.

Некоторые из доступных протеаз и пептидаз, обнаруженных в кишечной среде насекомого, зависят от стадии жизни насекомого, поскольку эти ферменты часто экспрессируются в пространстве и во времени. Пищеварительная система насекомого состоит из пищеварительного канала и связанных с ним желез. Пища попадает в рот и смешивается с выделениями, которые могут содержать или не содержать способствующие расщеплению протеазы и пептидазы. Передняя и задняя кишки имеют эктодермальное происхождение. Передняя кишка обычно служит хранилищем сырой пищи. Из передней кишки отдельные комки пищи проходят в среднюю кишку (мезентерон или желудочек). Средняя кишка является местом переваривания и всасывания пищевых питательных веществ. Как правило, присутствие определенных протеаз и пептидаз в средней кишке зависит от pH кишечника. Некоторые протеазы и пептидазы в желудочно-кишечном тракте человека могут включать: пепсин, трипсин, химотрипсин, эластазу, карбоксипептидазу, аминопептидазу и дипептидазу.

Кишечная среда насекомых включает области пищеварительной системы травоядных видов, где пептиды и белки расщепляются во время пищеварения. Некоторые из доступных протеаз и пептидаз, обнаруженных в кишечной среде насекомых, могут включать: (1) сериновые протеазы; (2) цистеиновые протеазы; (3) аспарагиновые протеазы и (4) металлопротеазы.

Двумя преобладающими классами протеаз в пищеварительных системах насекомых-фитофагов являются сериновые и цистеиновые протеазы. Murdock et al. (1987) провели подробное исследование ферментов средней кишки различных вредителей, принадлежащих к Coleoptera, а Srinivasan et al. (2008) сообщили о ферментах средней кишки различных вредителей, принадлежащих к Lepidoptera (чешуекрылым). Известно, что сериновые протеазы преобладают в кишечной среде личинок и обеспечивают около 95% общей расщепляющей активности чешуекрылых, в то время как виды жесткокрылых имеют более широкий спектр доминирующих протеаз кишечника, включая цистеиновые протеазы.

Семейство папаинов включает пептидазы с широким спектром активности, в том числе эндопептидазы с широкой специфичностью (такие как папаин), эндопептидазы с очень узкой специфичностью (такие как глицилэндопептидазы), аминопептидазы, дипептидилпептидазы и пептидазы с эндопептидазной и экзопептидазной активностью (такие как катепсины B и H). Другие иллюстративные протеиназы, обнаруженные в средней кишке различных насекомых, включают трипсиноподобные ферменты, например трипсин и химотрипсин, пепсин, карбоксипептидазу-B и аминотрипептидазы.

Сериновые протеазы широко распространены почти у всех животных и микроорганизмов (Joanitti et al., 2006). У высших организмов почти 2% генов кодируют эти ферменты (Barrette-Ng et al., 2003). Будучи незаменимыми для поддержания и выживания организма-хозяина, сериновые протеазы играют ключевую роль во многих биологических процессах. Сериновые протеазы классифицируют по их субстратной

специфичности, в частности, по тому, является ли остаток в P1 трипсиноподобным (Lys/Arg предпочтительнее в P1), химотрипсиноподобным (крупные гидрофобные остатки, такие как Phe/Tyr/Leu в P1) или эластазоподобный (небольшие гидрофобные остатки, такие как Ala/Val в P1) (рассмотрено в Tyndall et. al.., 2005). Сериновые протеазы представляют собой класс протеолитических ферментов, центральный каталитический механизм которых состоит из трех инвариантных остатков: аспарагиновой кислоты, гистидина и уникально реакционноспособного серина, последний из которых и дал название «каталитическая триада». Триаду Asp-His-Ser можно обнаружить по меньшей мере в четырех различных структурных контекстах (Hedstrom, 2002). Эти четыре клана сериновых протеаз характеризуются химотрипсином, субтилизином, Y-карбоксипептидазой и Clp-протеазой. Наиболее подробно изучены три сериновые протеазы химотрипсиноподобного клана: химотрипсин, трипсин и эластаза. Совсем недавно были обнаружены сериновые протеазы с новыми каталитическими триадами и диадами по их роли в расщеплении, включая Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His и N-концевой Ser.

Одним из классов хорошо изученных расщепляющих (пищеварительных) ферментов, обнаруживаемых в кишечной среде насекомых, является класс цистеиновых протеаз. Термин «цистеиновая протеаза» предназначен для описания протеазы, которая обладает высокореактивной тиольной группой цистеинового остатка в каталитическом центре фермента. Имеются данные о том, что многие насекомые-фитофаги и нематоды, паразитирующие на растениях, полагаются, по меньшей мере частично, на цистеиновые протеазы средней кишки для расщепления белков. К ним относятся, помимо прочего, Hemiptera, особенно клопы-плевательницы (Anasa tristis); зеленый клоп-вонючка (Acrosternum hilare); Riptortus clavatus и почти все исследованные к настоящему времени жесткокрылые, особенно колорадский жук (Leptinotarsa deaemlineata); трехрядный картофельный жук (Lema trilineata); спаржевая трещалка (Crioceris asparagi); мексиканский бобовый жук (Epilachna varivestis); хрущак малый булавоусый (Triolium castaneum); малый мучной хрущак (Tribolium confusum); землянные блошки (Chaetocnema spp., Haltica spp. и Epitrix spp.); кукурузный жук (Diabrotica Spp.); зерновка четырехпятнистая (Callosobruchus maculatus); хлопковый долгоносик (Antonomus grandis); рисовый долгоносик (Sitophilus oryza); кукурузный долгоносик (Sitophilus zeamais); амбарный долгоносик (Sitophilus granarius); египетский люцерновый долгоносик (Hypera postica); бобовый долгоносик (Acanthoseelides obtectus); зерновой точильщик (Rhyzopertha dominica); большой мучной хрущак (Tenebrio molitor); Thysanoptera (трипсы), особенно западный цветочный трипс (Frankliniella occidentalis); Diptera (двукрылые), особенно виды листового минера (Liriomyza trifolii); нематоды, паразитирующие на растениях, особенно картофельные цистообразующие нематоды (Globodera spp.), свекловичная нематода (Heterodera schachtii) и галловые нематоды (Meloidogyne spp.).

Другой класс расщепляющих (пищеварительных) ферментов - аспарагиновые протеазы. Термин «аспарагиновая протеаза» предназначен для описания протеазы,

которая имеет два высокореактивных остатка аспарагиновой кислоты в каталитическом центре фермента и которая чаще всего характеризуется специфическим ингибированием пепстатином, низкомолекулярным ингибитором почти всех известных аспарагиновых протеаз. Имеются данные о том, что многие насекомые-фитофаги частично полагаются на аспарагиновые протеазы средней кишки для расщепления белков, чаще всего в сочетании с цистеиновыми протеазами. К ним относятся, помимо прочего, Hemiptera, особенно (Rhodnius prolixus) и клоп (Cimex spp.) и члены семейств Phymatidae, Pentatomidae, Lygaeidae и Belostomatidae; Coleoptera (жесткокрылые) семейств Meloidae, Chrysomelidae, Coccinelidae и Bruchidae,все из инфраотряда Cucujiformia, особенно колорадский жук (Leptinotarsa decemlineata) трехрядный картофельный жук (Lematri lineata); южный и западный кукурузный жук (Diabrotica undecimpunctata и D. virgifera), хлопковый долгоносик (Anthonomus grandis), клоп-плевательница (Anasatristis); блошка крестоцветная (Phyllotreta crucifera), зерновка четырехпятнистая (Callosobruchus maculatus), мексиканский бобовый жук (Epilachna varivestis), соевый минер (Odontota horni), краевой пузырчатый жук (Epicauta pestifera) и хрущак малый булавоусый (Triolium castaneum); Diptera (двукрылые), особенно комнатная муха (Musca domestica). *См.* Terra and Ferreira (1994) Comn. Biochem. Physiol. 109B: 1-62; Wolfson and Murdock (1990) J. Chem. Ecol. 16: 1089-1102.

Введение полинуклеотидов в растения

Проблема, связанная с экспрессией гетерогенных полипептидов в трансгенных растениях, заключается в поддержании желаемого эффекта (например, инсектицидной активности) введенного полипептида при экспрессии в организме-хозяине; один из способов поддержания такого эффекта - увеличить вероятность правильной укладки белка за счет использования функционально связанного сигнального пептида эндоплазматического ретикулума (СПЭР). Другим способом поддержания эффекта трансгенного белка является введение стабилизирующего трансляцию белка (STA).

Растения могут быть временно или стабильно трансфицированы последовательностью ДНК, которая кодирует TVP или TVP-инсектицидный белок, содержащий один или несколько TVP, с использованием любого из способов трансфекции, описанных выше. В качестве альтернативы, растения могут быть трансфицированы полинуклеотидом, который кодирует TVP, при этом указанный TVP функционально связан с полинуклеотидом, который может кодировать сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР); линкером, стабилизирующим трансляцию белком (STA) или их комбинацией. Например, в некоторых вариантах осуществления трансгенное растение или геном растения можно трансформировать полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР); TVP и/или промежуточный линкерный пептид (LINKER или L), тем самым вызывая экспрессию мРНК, транскрибируемой с гетерогенной ДНК, в трансформированном растении, и впоследствии указанную мРНК транслируют в пептид.

Сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР)

Субклеточное нацеливание рекомбинантного белка на ЭР может быть достигнуто за счет использования СПЭР, функционально связанного с указанным рекомбинантным белком; это обеспечивает правильную сборку и/или укладку таких белков, а также высокий уровень накопления этих рекомбинантных белков в растениях. Примеры способов, касающихся компартментализации белков-хозяев во внутриклеточное хранилище, описанных в McCormick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(2):703-708, 1999; Staub et al., Nature Biotechnology 18:333-338, 2000; Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109, 1998 и Stoger et al., Plant Mol. Biol. 42:583-590, 2000, содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Соответственно, одним из способов достижения правильной сборки и/или укладки рекомбинантных белков является функциональное связывание сигнального пептида эндоплазматического ретикулума (СПЭР) с представляющим интерес рекомбинантным белком.

В некоторых вариантах осуществления пептид, содержащий сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), может быть функционально связан с TVP (обозначаемым как СПЭР-TVP), где указанный СПЭР представляет собой N-конец указанного пептида. В некоторых вариантах осуществления длина пептида СПЭР составляет от 3 до 60 аминокислот, от 5 до 50 аминокислот, от 20 до 30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СПЭР может включать в себя, помимо прочего, одно из следующего: BAAS; сигнальный пептид экстенсина табака; модифицированный сигнальный пептид экстенсина табака или сигнальный пептид Jun a 3 из Juniperus ashei. Например, в некоторых вариантах осуществления растение можно трансформировать нуклеотидом, который кодирует любой из пептидов, описанных в настоящем документе как сигнальные пептиды эндоплазматического ретикулума (СПЭР), и TVP.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), может быть функционально связан с TVP и промежуточным линкерным пептидом (L или Linker); такая конструкция обозначается как ERSP-L-TVP или ERSP-TVP-L, где указанный СПЭР представляет собой N-конец указанного белка, а указанный L или Linker может находиться либо на N-концевой стороне (выше) TVP, либо на C-концевой стороне (ниже) TVP. Белок, обозначенный как ERSP-L-TVP или ERSP-TVP-L, содержащий любой из СПЭР или TVP, описанных в настоящем документе, может иметь линкер «L», который может быть нерасщепляемым линкерным пептидом или расщепляемым линкерным пептидом, и который может расщепляться в клетках растений во время процесса экспрессии белка или может расщепляться в кишечной среде насекомого, и/или в среде гемолимфы.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать любой из промежуточных линкерных пептидов (LINKER или L), описанных в настоящем документе, включая, помимо прочего, следующие последовательности: IGER (SEQ ID NO:31), EEKKN, (SEQ ID NO:32) и ETMFKHGL (SEQ ID NO:33), ALKFLV (SEQ

ID NO:61), или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), может быть функционально связан с TVP, который, в свою очередь, функционально связан с стабилизирующим трансляцию белком (STA). В данном документе эта конфигурация обозначена как ERSP-STA-TVP или ERSP-TVP-STA, где указанный СПЭР представляет собой N-конец указанного белка, а указанный STA может быть либо на N-концевой стороне (выше) TVP, либо на C-концевой стороне (ниже) TVP. В некоторых вариантах осуществления белок, обозначенный как ERSP-STA-TVP или ERSP-TVP-STA, содержащий любой из СПЭР или TVP, описанных в настоящем документе, может быть функционально связан с STA, например, с любым из описанных стабилизирующих трансляцию белков, или изложенных в этом документе, включая GFP (зеленый флуоресцентный белок; SEQ ID NO:34; номер доступа NCBI № P42212) или Jun a 3 (Juniperus ashei; SEQ ID NO:36; номер доступа NCBI № P81295.1).

Растения могут быть временно или стабильно трансфицированы последовательностью ДНК, которая кодирует TVP или инсектицидный белок, содержащий один или несколько TVP, с использованием любого из способов трансфекции, описанных выше. Альтернативно, растения можно трансфицировать полинуклеотидом, который кодирует TVP, функционально связанным с полинуклеотидом, кодирующим белок СПЭР, LINKER и/или STA. Например, в некоторых вариантах осуществления трансгенное растение или геном растения могут быть трансфицированы для включения полинуклеотидной последовательности, которая кодирует сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР); TVP и/или промежуточный линкерный пептид (LINKER или L), тем самым вызывая экспрессию мРНК, транскрибированной с гетерогенной ДНК, в трансформированном растении.

Настоящее изобретение может быть использовано для трансформации любых видов растений, включая, помимо, однодольные и двудольные растения. Культуры, для которых трансгенный подход или РЕР был бы особенно пригодным подходом, включают, помимо прочего: люцерну, хлопок, томат, маис, пшеницу, кукурузу, сладкую кукурузу, люцерну, сою, сорго, полевой горох, льняное семя, сафлор, рапс, масличный рапс, рис, сою, ячмень, подсолнечник, деревья (в т.ч. хвойные и лиственные), цветы (в т.ч. выращиваемые в коммерческих целях и в теплицах), полевой люпин, просо, сахарный тростник, картофель, помидоры, табак, крестоцветные, перец, сахарную свеклу, ячмень и рапс, Brassica sp., рожь, просо, арахис, сладкий картофель, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливки, папайю, кешью, макадамию, миндаль, овес, овощи, декоративные и хвойные растения.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания (ОРС) экспрессии TVP, описанная в настоящем документе, представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая позволит растению экспрессировать мРНК, которая, в свою очередь, будет транслироваться в пептиды, экспрессироваться, надлежащим образом укладываться и/или накапливаться до такой степени, что указанные

белки обеспечат дозу, достаточную для ингибирования и/или уничтожения одного или нескольких вредителей. В одном варианте осуществления примером ОРС экспрессии белка TVP может быть вариант полинуклеотида U1-агатоксин-Ta1b (tvp), «ersp» (i.e., полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид СПЭР), «linker» (т.е. полинуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид LINKER), «sta» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид STA) или любая их комбинация, которые могут быть описаны в следующем формате уравнения:

ersp-sta-$(linker_i\text{-}tvp_j)_n$ или ersp-$(tvp_j\text{-}linker_i)_n$-sta

Приведенный выше иллюстративный вариант осуществления уравнения полинуклеотидов приводит к экспрессии следующего белкового комплекса: ERSP-STA-$(LINKER_I\text{-}TVP_J)_N$, содержащего четыре возможных пептидных компонента со знаками тире для разделения каждого компонента. Нуклеотидный компонент ersp представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий сигнальный пептид доставки в эндоплазматический ретикулум (СПЭР) растений. Компонент sta представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий стабилизирующий трансляцию белок (STA), который способствует накоплению TVP, экспрессируемого в растениях, однако в некоторых вариантах осуществления включение sta в ОРС экспрессии TVP может быть необязательным. Компонент $linker_i$ представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий промежуточный линкерный пептид (L или LINKER) для отделения TVP от других компонентов, содержащихся в ОРС, и от стабилизирующего трансляцию белка. Подстрочная буква «i» указывает на то, что в некоторых вариантах осуществления в ОРС экспрессии TVP можно использовать различные типы линкерных пептидов. Компонент «tvp» обозначает полинуклеотидный сегмент, кодирующий TVP (также известный как полинуклеотидная последовательность варианта U1-агатоксин-Ta1b). Подстрочная буква «j» указывает на то, что различные варианты полинуклеотидов U1-агатоксин-Ta1b могут быть включены в ОРС экспрессии TVP. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность варианта U1-агатоксин-Ta1b может кодировать TVP с аминокислотной заменой или аминокислотной делецией. Подстрочная буква «n», как показано в «$(linker_i\text{-}tvp_j)_n$», указывает, что структура нуклеотида, кодирующего промежуточный линкерный пептид и TVP, может повторяться «n» раз в одной и той же открытой рамке считывания в одной и той же ОРС экспрессии TVP, где «n» может быть любым целым числом от 1 до 10; «n» может быть от 1 до 10, в частности, «n» может быть равно 1, 2, 3, 4 или 5, а в некоторых вариантах осуществления «n» равно 6, 7, 8, 9 или 10. Повторы могут содержать полинуклеотидные сегменты, кодирующие разные промежуточные линкеры (LINKER) и разные TVP. Различные полинуклеотидные сегменты, включая повторы в одной и той же ОРС экспрессии TVP, находятся в одной и той же рамке трансляции. В некоторых вариантах осуществления включение полинуклеотида sta в ОРС экспрессии TVP может не требоваться. Например, последовательность полинуклеотида ersp может быть напрямую связана с полинуклеотидом, кодирующим вариант полинуклеотида TVP, без линкера.

В приведенном выше примерном уравнении полинуклеотид «tvp», кодирующий полипептид «TVP», может представлять собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует любой вариант полипептида U1-агатоксин-Ta1b. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид «tvp» может кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-X_6, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; и при этом X_6 представляет собой G или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид «tvp» может кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид «tvp» или комплементарная ему нуклеотидная последовательность, как указано в любой из SEQ NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, и 30.

В приведенном выше примерном уравнении полинуклеотид «tvp», кодирующий полипептид «TVP», может представлять собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует любой вариант полипептида U1-агатоксин-Ta1b. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид «tvp» может кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-X_6, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой G или отсутствует; и при этом , если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP начинается с ersp на 5’-конце. Чтобы TVP был должным образом уложен и функционировал, когда он экспрессируется из трансгенного растения, он должен иметь нуклеотид ersp, слитый в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим TVP. Во время процесса клеточной трансляции транслируемый СПЭР может направлять транслируемый TVP для встраивания в эндоплазматический ретикулум (ЭР) растительной клетки путем связывания с клеточным компонентом, называемым частицей распознавания сигнала.

Внутри ЭР пептид СПЭР расщепляется сигнальной пептидазой, и TVP высвобождается в ЭР, где TVP должным образом укладывается в процессе посттрансляционной модификации, например, образования дисульфидных связей. Без каких-либо дополнительных сигналов удержания белка белок транспортируется через ЭР в аппарат Гольджи, где он, наконец, секретируется за пределы плазматической мембраны в апопластическое пространство. TVP может эффективно накапливаться в апопластическом пространстве, достигая инсектицидной дозы в растениях.

Пептид СПЭР находится в N-концевой области транслируемого в растениях комплекса TVP, а часть СПЭР состоит из около 3-60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления она составляет от 5 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления она составляет от 10 до 40 аминокислот, но чаще всего состоит из 15-20 аминокислот; от 20 до 25 или от 25 до 30 аминокислот. СПЭР - это сигнальный пептид, названный так потому, что он управляет транспортировкой белка. Сигнальные пептиды также могут называться нацеливающими сигналами, сигнальными последовательностями, транзитными пептидами или сигналами локализации. Сигнальные пептиды для доставки в ЭР часто имеют длину от 15 до 30 аминокислотных остатков и имеют трехчастную организацию, состоящую из ядра гидрофобных остатков, окруженного положительно заряженным амино-концом и полярной, но незаряженной карбоксиконцевой областью. (Zimmermann, et al, “Protein translocation across the ER membrane,” Biochimica et Biohysica Acta, 2011, 1808: 912-924).

Известно много СПЭР. НЕ требуется, чтобы СПЭР получали из СПЭР растения, СПЭР не из растения будут работать с описанными в данном документе процедурами. Однако многие СПЭР растений хорошо известны, и в данном документе мы описываем некоторые СПЭР растений. Например, в некоторых вариантах осуществления СПЭР может представлять собой сигнальный пептид альфа-амилазы ячменя (BAAS), полученный из растения Hordeum vulgare и имеющий следующую аминокислотную последовательность: MANKHLSSLFLVLLGLSASLASG (SEQ ID NO:37).

СПЭР растений, выбранные из геномной последовательности белков, которые, как известно, экспрессируются и высвобождаются в апопластическое пространство растений, включают такие примеры, как BAAS, экстенсин моркови и PR1 табака. Следующие ссылки содержат дополнительные описания и полностью включены в настоящий документ посредством ссылки: De Loose, M. et al. “The extensin signal peptide allows secretion of a heterologous protein from protoplasts” Gene, 99 (1991) 95-100; De Loose, M. et al. описали структурный анализ экстенсин-кодирующего гена из Nicotiana plumbaginifolia, последовательность которого содержит типичный сигнальный пептид для транслокации белка в эндоплазматический ретикулум; Chen, M.H. et al. “Signal peptide-dependent targeting of a rice alpha-amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells” Plant Physiology, 2004 Jul; 135(3): 1367-77. Epub 2004 Jul 2. Chen, M.H. et al. изучали субклеточную локализацию α-амилаз в клетках растений, анализируя экспрессию α-амилазы с сигнальным пептидом и без него в трансгенном табаке. В этих и других

ссылках сообщается и описывается сигнальный пептид, который можно использовать в способах, процедурах и пептидных, белковых и нуклеотидных комплексах и конструкциях, описанных в настоящем документе.

Мотив сигнального пептида экстенсина табака представляет собой еще один иллюстративный тип СПЭР. *См.* Memelink et al, the Plant Journal, 1993, V4: 1011-1022; Pogue GP et al, Plant Biotechnology Journal, 2010, V8: 638-654, содержание которых включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP может иметь мотив сигнального пептида экстенсина табака. В одном варианте ОРС экспрессии TVP может иметь мотив экстенсина согласно SEQ ID NO:38. В другом варианте ОРС экспрессии TVP может иметь мотив экстенсина согласно SEQ ID NO:39.

Иллюстративный пример того, как создать вариант осуществления с сигнальным мотивом экстенсина, представлен ниже: последовательность ДНК, кодирующую мотив экстенсина, создают (например, последовательность ДНК, показанная в SEQ ID NO:40 или SEQ ID NO:41) с использованием ПЦР с удлинением олигонуклеотидов с четырьмя синтетическими ДНК-праймерами; концевые сайты, такие как сайт рестрикции, например, сайт рестрикции Pac I на 5'-конце и 5'-конец последовательности GFP на 3'-конце, могут быть добавлены с помощью ПЦР с последовательностью ДНК экстенсина, служащей матрицей, и в результате получают фрагмент; этот фрагмент используют в качестве прямого праймера для ПЦР для амплификации последовательности ДНК, кодирующей ОРС экспрессии TVP, например, «gfp-l-tvp», содержащейся в векторе pFECT, таким образом создавая ОРС экспрессии TVP, кодирующую (от N'-конца до C'-конца) «ERSP-GFP-L-TVP», где СПЭР представляет собой экстенсин. Полученную последовательность ДНК затем можно клонировать в сайты рестрикции Pac I и Avr II вектора FECT для создания вектора pFECT-TVP для транзиторной экспрессии в растении TVP, слитого с GFP.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративная система экспрессии может включать векторы экспрессии FECT, содержащие ОРС экспрессии TVP, трансформированные в Agrobacterium, GV3101, и трансформированный GV3101 вводят в листья табака для кратковременной экспрессии ОРС экспрессии TVP.

Стабилизирующий трансляцию белок (STA)

Стабилизирующий трансляцию белок (STA) может увеличивать количество TVP в тканях растений. Одной из ОРС экспрессии TVP, ERSP-TVP, достаточно для экспрессии должным образом уложенного TVP в трансфицированном растении, но в некоторых вариантах осуществления для эффективной защиты растения от повреждения вредителями может потребоваться накопление экспрессируемой в растении TVP. При трансфекции правильно сконструированной ОРС экспрессии TVP трансгенное растение может экспрессировать и накапливать большее количество должным образом уложенного TVP. Когда растение накапливает большее количество должным образом уложенных TVP, оно может легче сопротивляться, подавлять и/или убивать вредителей, которые нападают

на растения и поедают их. Одним из способов увеличения накопления полипептида в трансгенных тканях является использование стабилизирующего трансляцию белка (STA). Стабилизирующий трансляцию белок можно использовать для значительного увеличения накопления TVP в тканях растения и, таким образом, повышения эффективности растения, трансфицированного TVP, в отношении устойчивости к вредителям. Стабилизирующий трансляцию белок представляет собой белок с достаточной третичной структурой, чтобы он мог накапливаться в клетке, не подвергаясь клеточному процессу деградации белка. Следующие уравнения описывают два примера ОРС экспрессии TVP, которая кодирует стабилизирующий белок, слитый с полинуклеотидной последовательностью варианта U1-агатоксин-Ta1b:

ersp-sta-l-tvp или ersp-tvp-l-sta

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий трансляцию белок может представлять собой домен другого белка или может содержать всю последовательность белка. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий трансляцию белок может содержать от 5 до 50 аминокислот, от 50 до 250 аминокислот (например, ГНК), от 250 до 750 аминокислот (например, хитиназа) и от 750 до 1500 аминокислот (например, энханцин).

Один из вариантов осуществления стабилизирующего трансляцию белка может представлять собой полимер слитых белков, содержащий по меньшей мере один TVP. Конкретный пример стабилизирующего трансляцию белка представлен в данном документе, чтобы проиллюстрировать использование стабилизирующего трансляцию белка. Пример никоим образом не предназначен для ограничения изобретения или формулы изобретения. Применимые стабилизирующие трансляцию белки хорошо известны в данной области техники, и любые белки этого типа могут быть использованы, как описано в настоящем документе. Процедуры оценки и тестирования получения пептидов известны в данной области техники и описаны в данном документе. Одним из примеров одного стабилизирующего трансляцию белка является зеленый флуоресцентный белок (GFP, англ.: Green-Fluorescent Protein) (SEQ ID NO: 34; номер доступа NCBI № P42212.1).

Дополнительные примеры стабилизирующих трансляцию белков можно найти в следующих ссылках, содержание которых полностью включено посредством ссылки: Kramer, K.J. et al. “Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of Manduca sexta” Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 23, Issue 6, September 1993, pp. 691-701. Kramer, K.J. et al. isolated and sequenced a chitinase-encoding cDNA from the tobacco hornworm, Manduca sexta. Hashimoto, Y. et al. “Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus” Journal of General Virology, (1991), 72, 2645-2651. В этих и других ссылках сообщается и описываются стабилизирующие трансляцию белки, которые можно использовать в способах, процедурах и пептидных, белковых и нуклеотидных комплексах и конструкциях, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP может быть трансформирована в растении, например, в растении табака Nicotiana benthamiana, с использованием ОРС экспрессии TVP, которая содержит STA. Например, в некоторых вариантах осуществления STA может представлять собой Jun a 3. Зрелый Jun a 3 представляет собой защищающий растение белок ~30 кДа, который также является аллергеном для некоторых людей. Jun a 3 продуцируется деревьями Juniperus ashei и может использоваться в некоторых вариантах осуществления в качестве стабилизирующего трансляцию белка (STA). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность Jun a 3 может представлять собой последовательность, указанную в SEQ ID NO:36. В других вариантах осуществления аминокислотная последовательность Jun a 3 может представлять собой последовательность, указанную в SEQ ID NO:42.

Линкеры

Белки-линкеры способствуют правильной укладке различных мотивов, составляющих ОРС экспрессии TVP. ОРС экспрессии TVP, описанная в данном изобретении, также включает полинуклеотидные последовательности, кодирующие промежуточные линкерные пептиды между полинуклеотидными последовательностями, кодирующими TVP (tvp) и стабилизирующий трансляцию белок (sta), или между полинуклеотидными последовательностями, кодирующими несколько полинуклеотидных последовательностей, кодирующих TVP, т.е. $(l\text{-}tvp)_N$ or $(tvp\text{-}l)_N$, если экспрессия ОРС включает экспрессию нескольких доменов TVP. Промежуточные линкерные пептиды (LINKERS или L или L_{INK}) разделяют различные части экспрессируемой конструкции TVP и способствуют правильной укладке различных частей комплекса в процессе экспрессии. В экспрессируемой конструкции TVP могут быть задействованы различные промежуточные линкерные пептиды для разделения различных функциональных доменов. В некоторых вариантах осуществления LINKER присоединен к TVP, и эта двухвалентная группа может повторяться до 10 (N=1-10) и, возможно, даже более 10 раз (например, N=200), чтобы облегчить накопление должным образом уложенного TVP в растении, которое необходимо защитить.

В некоторых вариантах осуществления длина промежуточного линкерного пептида может составлять от 1 до 30 аминокислот. Однако он не обязательно является важным компонентом экспрессируемого TVP у растений. Расщепляемый линкерный пептид может быть сконструирован для ОРС экспрессии TVP для высвобождения надлежащего TVP из экспрессированного комплекса TVP в трансформированном растении для улучшения защиты, которую TVP обеспечивает растению в отношении повреждения вредителями. Одним типом промежуточного линкерного пептида является расщепляемый линкерный пептид растения. Этот тип линкерных пептидов может быть полностью удален из экспрессируемого комплекса ОРС экспрессии TVP во время посттрансляционной модификации растения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления должным образом уложенный TVP, связанный этим типом промежуточных линкерных пептидов,

может высвобождаться в клетках растения из экспрессированного комплекса ОРС экспрессии TVP во время посттрансляционной модификации в растении.

Другой тип расщепляемого промежуточного линкерного пептида не расщепляется в процессе экспрессии в растениях. Однако он имеет сайт расщепления протеазами, специфичный для сериновых, треониновых, цистеиновых, аспартатных протеаз или металлопротеаз. Тип расщепляемого линкерного пептида может расщепляться протеазами, обнаруженными в кишечной среде насекомых и чешуекрылых и/или в среде гемолимфы насекомых и гемолимфы чешуекрылых, с высвобождением TVP в кишечнике или гемолимфе насекомых. Используя информацию, изложенную в данном изобретении, для специалиста в данной области техники должно стать обычным делом создание или поиск других примеров линкеров, которые будут применимы в данном изобретении.

В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP может содержать промежуточный линкер расщепляемого типа, например типа, указанного в SEQ ID NO:31, имеющего аминокислотный код «IGER» (SEQ ID NO:31). Молекулярная масса этого промежуточного линкера или LINKER составляет 473,53 Дальтон. В других вариантах осуществления промежуточный линкерный пептид (LINKER) также может быть пептидом без любого типа сайта расщепления протеазой, то есть нерасщепляемым промежуточным пептидом, например, линкером «ETMFKHGL» (SEQ ID NO:33).

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать два или более расщепляемых пептида, при этом инсектицидный белок содержит расщепляемый насекомыми линкер (L), причем расщепляемый насекомыми линкер слит в рамке с конструкцией, содержащей $(TVP\text{-}L)_n$, где «n» представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10. В другом варианте осуществления TVP-инсектицидный белок, описанный в настоящем документе, содержит сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), функционально связанный с TVP, который функционально связан с расщепляемым насекомым линкером (L) и/или повторяющейся конструкцией $(L\text{-}TVP)_n$ или $(TVP\text{-}L)_n$, где n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий сигнальный пептид эндоплазматического ретикулума (СПЭР), может быть функционально связан с TVP и промежуточным линкерным пептидом (L или Linker); такая конструкция обозначается как ERSP-L-TVP или ERSP-TVP-L, где указанный СПЭР представляет собой N-конец указанного белка, а указанный L или Linker может находиться либо на N-концевой стороне (выше) TVP, либо на С-концевой стороне (ниже) TVP. Белок, обозначенный как ERSP-L-TVP или ERSP-TVP-L, содержащий любой из СПЭР или TVP, описанных в настоящем документе, может иметь линкер «L», который может быть нерасщепляемым линкерным пептидом или расщепляемым линкерным пептидом, и который может расщепляться в клетках растений во время процесса экспрессии белка или может расщепляться в кишечной среде насекомого, и/или в среде гемолимфы.

В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может

содержать любой из промежуточных линкерных пептидов (LINKER или L), описанных в настоящем документе, включая, помимо прочего, следующие последовательности: IGER (SEQ ID NO:181), EEKKN, (SEQ ID NO:182) и ETMFKHGL (SEQ ID NO:183), или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой один или несколько из следующих: ALKFLV (SEQ ID NO: 61), ALKLFV (SEQ ID NO: 62), IFVRLR (SEQ ID NO: 63), LFAAPF (SEQ ID NO: 64), ALKFLVGS (SEQ ID NO: 65), ALKLFVGS (SEQ ID NO: 66), IFVRLRGS (SEQ ID NO: 67), LFAAPFGS (SEQ ID NO: 68), LFVRLRGS (SEQ ID NO: 69) и/или LGERGS (SEQ ID NO: 70).

Примерное описание вышеуказанных линкеров, а также способов их получения и применения представлено в публикации патентной заявки США № US 20180362598 A1, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В различных вариантах осуществления типичный инсектицидный белок может включать белковую конструкцию, содержащую: (ERSP)-(TVP-L)$_n$; (ERSP)-(L)-(TVP-L)$_n$; (ERSP)-(L-TVP)$_n$; (ERSP)-(L-TVP)$_n$-(L); где n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, или от 1 до 100, или от 1 до 10. В различных схожих вариантах осуществления, описанных выше, TVP представляет собой вариант пептида Ta1b, L представляет собой нерасщепляемый или расщепляемый пептид, а n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200, предпочтительно целое число в диапазоне от 1 до 100, и более предпочтительно целое число в диапазоне от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления TVP-инсектицидный белок может содержать одинаковые или разные пептиды TVP, а также одинаковые или разные расщепляемые насекомыми пептиды. В некоторых вариантах осуществления С-концевой TVP функционально связан на своем С-конце с расщепляемым пептидом, который расщепляется в кишечной среде насекомого. В некоторых вариантах осуществления N-концевой TVP функционально связан на своем N-конце с расщепляемым пептидом, который расщепляется в кишечной среде насекомого.

Некоторые из доступных протеаз и пептидаз, обнаруженных в кишечной среде насекомого, зависят от стадии жизни насекомого, поскольку эти ферменты часто экспрессируются в пространстве и во времени. Пищеварительная система насекомого состоит из пищеварительного канала и связанных с ним желез. Пища попадает в рот и смешивается с выделениями, которые могут содержать или не содержать способствующие расщеплению протеазы и пептидазы. Передняя и задняя кишки имеют эктодермальное происхождение. Передняя кишка обычно служит хранилищем сырой пищи. Из передней кишки отдельные комки пищи проходят в среднюю кишку (мезентерон или желудочек). Средняя кишка является местом переваривания и всасывания пищевых питательных веществ. Как правило, присутствие определенных протеаз и пептидаз в средней кишке зависит от pH кишечника. Некоторые протеазы и пептидазы в желудочно-кишечном тракте человека могут включать: пепсин, трипсин, химотрипсин, эластазу, карбоксипептидазу, аминопептидазу и дипептидазу.

Кишечная среда насекомых включает области пищеварительной системы

травоядных видов, где пептиды и белки расщепляются во время пищеварения. Некоторые из доступных протеаз и пептидаз, обнаруженных в кишечной среде насекомых, могут включать: (1) сериновые протеазы; (2) цистеиновые протеазы; (3) аспарагиновые протеазы и (4) металлопротеазы.

Двумя преобладающими классами протеаз в пищеварительных системах насекомых-фитофагов являются сериновые и цистеиновые протеазы. Murdock et al. (1987) провели подробное исследование ферментов средней кишки различных вредителей, принадлежащих к Coleoptera, а Srinivasan et al. (2008) сообщили о ферментах средней кишки различных вредителей, принадлежащих к Lepidoptera (чешуекрылым). Известно, что сериновые протеазы преобладают в кишечной среде личинок и обеспечивают около 95% общей расщепляющей активности чешуекрылых, в то время как виды жесткокрылых имеют более широкий спектр доминирующих протеаз кишечника, включая цистеиновые протеазы.

Семейство папаинов включает пептидазы с широким спектром активности, в том числе эндопептидазы с широкой специфичностью (такие как папаин), эндопептидазы с очень узкой специфичностью (такие как глицилэндопептидазы), аминопептидазы, дипептидилпептидазы и пептидазы с эндопептидазной и экзопептидазной активностью (такие как катепсины B и H). Другие иллюстративные протеиназы, обнаруженные в средней кишке различных насекомых, включают трипсиноподобные ферменты, например трипсин и химотрипсин, пепсин, карбоксипептидазу-B и аминотрипептидазы.

Сериновые протеазы широко распространены почти у всех животных и микроорганизмов (Joanitti et al., 2006). У высших организмов почти 2% генов кодируют эти ферменты (Barrette-Ng et al., 2003). Будучи незаменимыми для поддержания и выживания организма-хозяина, сериновые протеазы играют ключевую роль во многих биологических процессах. Сериновые протеазы классифицируют по их субстратной специфичности, в частности, по тому, является ли остаток в P1 трипсиноподобным (Lys/Arg предпочтительнее в P1), химотрипсиноподобным (крупные гидрофобные остатки, такие как Phe/Tyr/Leu в P1) или эластазоподобный (небольшие гидрофобные остатки, такие как Ala/Val в P1) (рассмотрено в Tyndall et. al., 2005). Сериновые протеазы представляют собой класс протеолитических ферментов, центральный каталитический механизм которых состоит из трех инвариантных остатков: аспарагиновой кислоты, гистидина и уникально реакционноспособного серина, последний из которых и дал название «каталитическая триада». Триаду Asp-His-Ser можно обнаружить по меньшей мере в четырех различных структурных контекстах (Hedstrom, 2002). Эти четыре клана сериновых протеаз характеризуются химотрипсином, субтилизином, Y-карбоксипептидазой и Clp-протеазой. Наиболее подробно изучены три сериновые протеазы химотрипсиноподобного клана: химотрипсин, трипсин и эластаза. Совсем недавно были обнаружены сериновые протеазы с новыми каталитическими триадами и диадами по их роли в расщеплении, включая Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His и N-концевой Ser.

Одним из классов хорошо изученных расщепляющих (пищеварительных) ферментов, обнаруживаемых в кишечной среде насекомых, является класс цистеиновых протеаз. Термин «цистеиновая протеаза» предназначен для описания протеазы, которая обладает высокореактивной тиольной группой цистеинового остатка в каталитическом центре фермента. Имеются данные о том, что многие насекомые-фитофаги и нематоды, паразитирующие на растениях, полагаются, по меньшей мере частично, на цистеиновые протеазы средней кишки для расщепления белков. К ним относятся, помимо прочего, Hemiptera, особенно клопы-плевательницы (Anasa tristis); зеленый клоп-вонючка (Acrosternum hilare); Riptortus clavatus и почти все исследованные к настоящему времени жесткокрылые, особенно колорадский жук (Leptinotarsa deaemlineata); трехрядный картофельный жук (Lema trilineata); спаржевая трещалка (Crioceris asparagi); мексиканский бобовый жук (Epilachna varivestis); хрущак малый булавоусый (Triolium castaneum); малый мучной хрущак (Tribolium confusum); землянные блошки (Chaetocnema spp., Haltica spp. и Epitrix spp.); кукурузный жук (Diabrotica Spp.); зерновка четырехпятнистая (Callosobruchus maculatus); хлопковый долгоносик (Antonomus grandis); рисовый долгоносик (Sitophilus oryza); кукурузный долгоносик (Sitophilus zeamais); амбарный долгоносик (Sitophilus granarius); египетский люцерновый долгоносик (Hypera postica); бобовый долгоносик (Acanthoseelides obtectus); зерновой точильщик (Rhyzopertha dominica); большой мучной хрущак (Tenebrio molitor); Thysanoptera (трипсы), особенно западный цветочный трипс (Frankliniella occidentalis); Diptera (двукрылые), особенно виды листового минера (Liriomyza trifolii); нематоды, паразитирующие на растениях, особенно картофельные цистообразующие нематоды (Globodera spp.), свекловичная нематода (Heterodera schachtii) и галловые нематоды (Meloidogyne spp.).

Другой класс расщепляющих (пищеварительных) ферментов - аспарагиновые протеазы. Термин «аспарагиновая протеаза» предназначен для описания протеазы, которая имеет два высокореактивных остатка аспарагиновой кислоты в каталитическом центре фермента и которая чаще всего характеризуется специфическим ингибированием пепстатином, низкомолекулярным ингибитором почти всех известных аспарагиновых протеаз. Имеются данные о том, что многие насекомые-фитофаги частично полагаются на аспарагиновые протеазы средней кишки для расщепления белков, чаще всего в сочетании с цистеиновыми протеазами. К ним относятся, помимо прочего, Hemiptera, особенно (Rhodnius prolixus) и клоп (Cimex spp.) и члены семейств Phymatidae, Pentatomidae, Lygaeidae и Belostomatidae; Coleoptera (жесткокрылые) семейств Meloidae, Chrysomelidae, Coccinelidae и Bruchidae,все из инфраотряда Cucujiformia, особенно колорадский жук (Leptinotarsa decemlineata) трехрядный картофельный жук (Lematri lineata); южный и западный кукурузный жук (Diabrotica undecimpunctata и D. virgifera), хлопковый долгоносик (Anthonomus grandis), клоп-плевательница (Anasatristis); блошка крестоцветная (Phyllotreta crucifera), зерновка четырехпятнистая (Callosobruchus maculatus), мексиканский бобовый жук (Epilachna varivestis), соевый минер (Odontota horni), краевой пузырчатый жук (Epicauta pestifera) и хрущак малый булавоусый (Triolium

castaneum); Diptera (двукрылые), особенно комнатная муха (Musca domestica). *См.* Terra and Ferreira (1994) Comn. Biochem. Physiol. 109B: 1-62; Wolfson and Murdock (1990) J. Chem. Ecol. 16: 1089-1102.

Другие примеры промежуточных линкерных пептидов можно найти в следующих источниках, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки: было обнаружено, что растительный предшественник ингибитора сериновой протеиназы содержит пять гомогенных белковых ингибиторов, разделенных шестью одинаковыми линкерными пептидами, как описано в Heath et al. "Characterization of the protease processing sites in a multidomain proteinase inhibitor precursor from Nicotiana alata" European Journal of Biochemistry, 1995; 230: 250-257. Сравнение профиля укладки зеленых флуоресцентных белков через шесть различных линкеров исследуется в Chang, H.C. et al. "De novo folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria" Journal of Molecular Biology, 2005 Oct 21; 353(2): 397-409. Было показано в Daskalova, S.M. et al. "Engineering of N. benthamiana L. plants for production of N-acetylgalactosamine-glycosylated proteins" BMC Biotechnology, 2010 Aug 24; 10: 62, что изоформа семейства GalNAc-Ts человека, GalNAc-T2, сохраняет свою локализацию и функциональность при экспрессии в растениях N. benthamiana. Способность эндогенных пластидных белков проходить через стромулы была показана в Kwok, E.Y. et al. "GFP-labelled Rubisco and aspartate aminotransferase are present in plastid stromules and traffic between plastids" Journal of Experimental Botany, 2004 Mar; 55(397): 595-604. Epub 2004 Jan 30. Отчет о конструировании поверхности вируса табачной мозаики (ВТМ), вириона, с декапептидным гормоном комара, трипсин-модулирующим оостатическим фактором (ТМОФ), был представлен Borovsky, D. et al. "Expression of Aedes trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide" Proc Natl Acad Sci, 2006 December 12; 103(50): 18963-18968. В этих и других источниках описываются промежуточные линкеры, которые можно использовать в способах, процедурах и пептидных, белковых и нуклеотидных комплексах и конструкциях, описанных в настоящем документе.

ОРС TVP и конструкции TVP

«ОРС TVP» относится к нуклеотиду, кодирующему TVP, и/или один или несколько стабилизирующих белков, секреторных сигналов или сигналов, направляющих на мишень, например, СПЭР или STA, и определяется как нуклеотиды в ОРС, которые обладают способностью к трансляции. Таким образом, «диаграмма ОРС TVP» относится к композиции одной или нескольких ОРС TVP, записанных в форме диаграммы или уравнения. Например, «диаграмма ОРС TVP» может быть записана с использованием акронимов или сокращенных ссылок на сегменты ДНК, содержащиеся в ОРС экспрессии. Соответственно, в одном примере «диаграмма ОРС TVP» может описывать полинуклеотидные сегменты, кодирующие СПЭР, LINKER, STA и TVP, посредством диаграммы в форме уравнения сегментов ДНК как «ersp» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид СПЭР); «linker» или «L» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид LINKER); «sta» (т. е.

полинуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид STA) и «tvp» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая TVP), соответственно. Примером диаграммы ОРС TVP является «ersp-sta-(linker$_i$-tvp$_j$)$_N$» или «ersp-(tvp$_j$-linker$_i$)$_N$-sta» и/или любая комбинация их сегментов ДНК.

Следующие уравнения описывают два примера ОРС TVP, которые кодируют СПЭР, STA, линкер и TVP:

ersp-sta-l-tvp или ersp-tvp-l-sta

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания (ОРС) TVP, описанная в настоящем документе, представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая позволит растению экспрессировать мРНК, которая, в свою очередь, будет транслироваться в пептиды, которые будут должным образом укладываться и/или накапливаться до такой степени, что указанные белки обеспечат дозу, достаточную для ингибирования и/или уничтожения одного или нескольких вредителей. В одном варианте осуществления примером ОРС белка TVP может быть полинуклеотид, кодирующий TVP (tvp), «ersp» (i.e., полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид СПЭР), «linker» (т.е. полинуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид LINKER), «sta» (т. е. полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид STA) или любая их комбинация, которые могут быть описаны в следующем формате уравнения:

ersp-sta-(linker$_i$-tvp$_j$)$_n$ или ersp-(tvp$_j$-linker$_i$)$_n$-sta

Приведенный выше иллюстративный вариант осуществления уравнения полинуклеотидов приводит к экспрессии следующего белкового комплекса: ERSP-STA-(LINKER$_I$-TVP$_J$)$_N$, содержащего четыре возможных пептидных компонента со знаками тире для разделения каждого компонента. Нуклеотидный компонент ersp представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий сигнальный пептид доставки в эндоплазматический ретикулум (СПЭР) растений. Компонент sta представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий стабилизирующий трансляцию белок (STA), который способствует накоплению TVP, экспрессируемого в растениях, однако в некоторых вариантах осуществления включение sta в ОРС TVP может быть необязательным. Компонент linker$_i$ представляет собой полинуклеотидный сегмент, кодирующий промежуточный линкерный пептид (L или LINKER) для отделения TVP от других компонентов, содержащихся в ОРС, и от стабилизирующего трансляцию белка. Подстрочная буква «i» указывает на то, что в некоторых вариантах осуществления в ОРС TVP можно использовать различные типы линкерных пептидов. Компонент «tvp» обозначает полинуклеотидный сегмент, кодирующий TVP. Подстрочная буква «j» указывает на то, что в ОРС TVP могут быть включены разные полинуклеотиды. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность может кодировать TVP с другой аминокислотной заменой. Подстрочная буква «n», как показано в «(linker$_i$-tvp$_j$)$_n$», указывает, что структура нуклеотида, кодирующего промежуточный линкерный пептид и TVP, может повторяться «n» раз в одной и той же

открытой рамке считывания в одной и той же ОРС TVP, где «n» может быть любым целым числом от 1 до 10; «n» может быть от 1 до 10, в частности, «n» может быть равно 1, 2, 3, 4 или 5, а в некоторых вариантах осуществления «n» равно 6, 7, 8, 9 или 10. Повторы могут содержать полинуклеотидные сегменты, кодирующие разные промежуточные линкеры (LINKER) и разные TVP. Различные полинуклеотидные сегменты, включая повторы в одной и той же ОРС TVP, находятся в одной и той же рамке трансляции. В некоторых вариантах осуществления включение полинуклеотида sta в ОРС TVP может не требоваться. Например, последовательность полинуклеотида ersp может быть напрямую связана с полинуклеотидом, кодирующим вариант полинуклеотида TVP, без линкера.

В приведенном выше примерном уравнении полинуклеотид «tvp», кодирующий полипептид «TVP», может представлять собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует любой TVP, как описано в настоящем документе, например, TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ей нуклеотидную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид tvp или полинуклеотид, способный кодировать TVP, может кодировать TVP, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид способен кодировать TVP-инсектицидный белок, имеющий следующую ориентацию и/или расположение конструкции TVP: ERSP-TVP; ERSP-$(TVP)_N$; ERSP-TVP-L; ERSP-$(TVP)_N$-L; ERSP-$(TVP\text{-}L)_N$; ERSP-L-TVP; ERSP-L-$(TVP)_N$; ERSP-$(L\text{-}TVP)_N$; ERSP-STA-TVP; ERSP-STA-$(TVP)_N$; ERSP-TVP-STA; ERSP-$(TVP)_N$-STA; ERSP-$(STA\text{-}TVP)_N$; ERSP-$(TVP\text{-}STA)_N$; ERSP-L-TVP-STA; ERSP-L-STA-TVP; ERSP-L-$(TVP\text{-}STA)_N$; ERSP-L-$(STA\text{-}TVP)_N$; ERSP-L-$(TVP)_N$-STA; ERSP-$(L\text{-}TVP)_N$-STA; ERSP-$(L\text{-}STA\text{-}TVP)_N$; ERSP-$(L\text{-}TVP\text{-}STA)_N$; ERSP-$(L\text{-}STA)_N$-TVP; ERSP-$(L\text{-}TVP)_N$-STA; ERSP-STA-L-TVP; ERSP-STA-TVP-L; ERSP-STA-L-$(TVP)_N$; ERSP-$(STA\text{-}L)_N$-TVP; ERSP-STA-$(L\text{-}TVP)_N$; ERSP-$(STA\text{-}L\text{-}TVP)_N$; ERSP-STA-$(TVP)_N$-L; ERSP-STA-$(TVP\text{-}L)_N$; ERSP-$(STA\text{-}TVP)_N$-L; ERSP-$(STA\text{-}TVP\text{-}L)_N$; ERSP-TVP-L-STA; ERSP-TVP-STA-L; ERSP-$(TVP)_N$-STA-L ERSP-$(TVP\text{-}L)_N$-STA; ERSP-$(TVP\text{-}STA)_N$-L; ERSP-$(TVP\text{-}L\text{-}STA)_N$ или ERSP-$(TVP\text{-}STA\text{-}L)_N$; при этом N представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 200.

В некоторых вариантах осуществления любая из ОРС TVP и/или конструкций TVP, описанных в настоящем документе, может быть получена рекомбинантным путем, например, в некоторых вариантах осуществления любая из ОРС TVP и/или конструкций TVP, описанных в настоящем документе, может быть получена в клеточной культуре,

например, с помощью дрожжевой клетки.

Любой из вышеупомянутых способов и/или любой из способов, описанных в настоящем документе, можно использовать для включения в растение или его часть растения одного или нескольких полинуклеотидов, способных экспрессировать любой один или несколько TVP или TVP-инсектицидных белков, как описано в данном документе; например, один или несколько TVP или TVP-инсектицидных белков, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, которые также описаны в настоящем документе.

Настоящее изобретение может быть использовано для трансформации любых видов растений, включая, помимо, однодольные и двудольные растения. Культуры, для которых трансгенный подход или PEP был бы особенно пригодным подходом, включают, помимо прочего: люцерну, хлопок, томат, маис, пшеницу, кукурузу, сладкую кукурузу, люцерну, сою, сорго, полевой горох, льняное семя, сафлор, рапс, масличный рапс, рис, сою, ячмень, подсолнечник, деревья (в т.ч. хвойные и лиственные), цветы (в т.ч. выращиваемые в коммерческих целях и в теплицах), полевой люпин, просо, сахарный тростник, картофель, помидоры, табак, крестоцветные, перец, сахарную свеклу, ячмень и рапс, Brassica sp., рожь, просо, арахис, сладкий картофель, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливки, папайю, кешью, макадамию, миндаль, овес, овощи, декоративные и хвойные растения.

Трансформация растений полинуклеотидами

В некоторых вариантах осуществления ОРС и конструкции TVP, экспрессирующие TVP, описанные выше в настоящем документе, могут быть клонированы в любой вектор экспрессии растения для экспрессии TVP в растениях либо временно, либо стабильно.

Временную систему экспрессии растений можно использовать для быстрой оптимизации структуры ОРС экспрессии TVP для некоторой специфической экспрессии TVP в растениях, включая необходимость некоторых компонентов, оптимизацию кодонов некоторых компонентов, оптимизацию порядка каждого компонента и т. д. Временный вектор экспрессии растения часто получают из генома вируса растения. Вирусные векторы растений обеспечивают преимущества быстрой и высокой экспрессии чужеродных генов в растении благодаря инфекционной природе вирусов растений. Полная длина вирусного генома растения может быть использована в качестве вектора, но часто удаляют вирусный компонент, например белок оболочки, и в этом месте субклонируют трансгенные ОРС. ОРС экспрессии TVP можно субклонировать в такой сайт для создания вирусного вектора. Эти вирусные векторы могут быть введены в растения механически, поскольку они сами по себе инфекционные, например, через рану растения, распыление и т. д. Они также могут быть трансфицированы в растения посредством агроинфекции путем клонирования вирусного вектора в Т-ДНК бактерии корончатого галла, Agrobacterium tumefaciens, или бактерии «волосатого корня», Agrobacterium rhizogenes. Экспрессия TVP в этом векторе контролируется репликацией РНК вируса, а трансляция вируса в мРНК для репликации контролируется сильным

вирусным промотором, например промотором 35S вируса мозаики цветной капусты. Вирусные векторы с ОРС экспрессии TVP обычно клонируют в область Т-ДНК в бинарном векторе, который может реплицироваться как в штаммах E. coli, так и в штаммах Agrobacterium. Временную трансфекцию растения можно осуществить путем инфильтрации листьев растения клетками Agrobacterium, которые содержат вирусный вектор для экспрессии TVP. Во временно трансформированном растении экспрессия чужеродного белка обычно прекращается в течение короткого периода времени из-за посттранскрипционного сайленсинга генов (PTGS). Иногда ген белка-супрессора PTGS необходимо временно совместно трансформировать в растение с помощью вирусного вектора того же типа, который управляет экспрессией ОРС экспрессии TVP. Это улучшает и расширяет экспрессию TVP в растении. Наиболее часто используемым белком-супрессором PTGS является белок P19, обнаруженный в вирусе кустистой карликовости томатов (TBSV).

В некоторых вариантах осуществления временная трансфекция растений может быть достигнута путем рекомбинации полинуклеотида, кодирующего TVP, с любым из легкодоступных векторов (см. описанные выше в настоящем документе) и подтверждения с использованием маркера или сигнала (например, эмиссии GFP). В некоторых вариантах осуществления временно трансфицированное растение может быть создано путем рекомбинации полинуклеотида, кодирующего TVP, с ДНК, кодирующей слитый белок GFP-гибрид, в векторе и трансфекции указанного вектора в растение (например, табак) с использованием различных векторов FECT, предназначенных для целенаправленное экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TVP, может быть рекомбинирован с вектором pFECT для накопления в APO (локализация в апопласте); вектором pFECT для накопления в CYTO (цитоплазматическая локализация) или pFECT с вектором ersp для накопления в ЭР(локализация в эндоплазматическом ретикулуме).

Примером стратегии временной трансформации растений является агроинфекция с использованием вирусного вектора растений благодаря его высокой эффективности, простоте и низкой стоимости. В некоторых вариантах осуществления систему сверхэкспрессии вируса табачной мозаики можно использовать для временной трансформации растений TVP. См. TRBO, Lindbo JA, Plant Physiology, 2007, V145: 1232-1240, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ДНК-вектор TRBO имеет область Т-ДНК для агроинфекции, которая содержит промотор CaMV 35S, который управляет экспрессией РНК вируса табачной мозаики без гена, кодирующего белок вирусной оболочки. Более того, в этой системе используется «обезвреженный» вирусный геном, поэтому передача вируса от растения к растению может быть эффективно предотвращена.

В другом варианте осуществления временная система вирусной экспрессии растений FECT может быть использована для временной трансформации растений TVP.

См. Liu Z & Kearney CM, BMC Biotechnology, 2010, 10:88, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Вектор FECT содержит область Т-ДНК для агроинфекции, которая содержит промотор CaMV 35S, который управляет экспрессией РНК вируса мозаики лисохвоста без генов, кодирующих белок вирусной оболочки, и тройного блока генов. Более того, в этой системе используется «обезвреженный» вирусный геном, поэтому передача вируса от растения к растению может быть эффективно предотвращена. Для эффективной экспрессии введенного гетерологичного гена система экспрессии FECT дополнительно должна коэкспрессировать P19, белок-супрессор сайленсинга РНК вируса кустистой карликовости томата, чтобы предотвратить посттранскрипционного сайленсинга гена (PTGS) введенной Т-ДНК (система экспрессии TRBO не требует коэкспрессии P19).

В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP может быть сконструирована так, чтобы кодировать серию трансляционно слитых структурных мотивов, которые можно описать следующим образом: N'-ERSP-STA-L-TVP-C', где «N» и «C'» указывает на N-концевую и С-концевую аминокислоты, соответственно, а мотив СПЭР может представлять собой сигнальный пептид альфа-амилазы ячменя (BAAS) (SEQ ID NO:37); стабилизирующий белок (STA) может представлять собой GFP (SEQ ID NO:34); линкерный пептид «L» может представлять собой IGER (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления ОРС ersp-sta-l-tvp может быть химически синтезирована с включением сайтов рестрикции, например, сайта рестрикции Pac I на ее 5'-конце и сайта рестрикции Avr II на ее 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления ОРС экспрессии TVP можно клонировать в сайты рестрикции Pac I и Avr II вектора экспрессии FECT (pFECT) для создания вектора экспрессии варианта U1-агатоксин-Ta1b для временной системы экспрессии растений FECT (pFECT-TVP). Чтобы максимизировать экспрессию в системе экспрессии FECT, некоторые варианты осуществления могут иметь вектор FECT, экспрессирующий белок-супрессор P19 сайленсинга РНК (pFECT-P19), созданный для совместной трансформации.

В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии варианта U1-агатоксин-Ta1b может быть рекомбинирован для использования во временной системе экспрессии растения TRBO, например, путем выполнения рутинной процедуры ПЦР и добавления сайта рестрикции Not I к 3'-концу ОРС экспрессии TVP, описанной выше, и затем клонирования ОРС экспрессии TVP в сайты рестрикции Pac I и Not I вектора экспрессии TRBO (pTRBO-TVP).

В некоторых вариантах осуществления штамм Agrobacterium tumefaciens, например, коммерчески доступные клетки GV3101, можно использовать для временной экспрессии ОРС экспрессии TVP в ткани растения (например, в листьях табака) с использованием одной или нескольких систем временной экспрессии, например, системы экспрессии FECT и TRBO. Примерная иллюстрация такого протокола временной трансфекции включает следующее: ночная культура GV3101 может быть использована для инокуляции 200 мл среды Луриа-Бертани (LB); клетки можно выращивать до

логарифмической фазы с OD600 между 0,5 и 0,8; затем клетки можно осадить центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут при 4°C; затем клетки можно промыть один раз 10 мл предварительно охлажденного буфера TE (Трис-HCl 10 мМ, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), а затем ресуспендировать в 20 мл среды LB; повторную суспензию клеток GV3101 затем можно разделить на аликвоты фракциями по 250 мкл в микропробирки объемом 1,5 мл; аликвоты затем можно быстро заморозить в жидком азоте и хранить при температуре -80°C в морозильной камере для будущей трансформации. Затем векторы pFECT-TVP и pTRBO-TVP можно трансформировать в компетентные клетки GV3101 с использованием метода замораживания-размораживания следующим образом: хранившиеся компетентные клетки GV3101 размораживают на льду и смешивают с 1-5 мкг чистой ДНК (вектор pFECT-TVP или pTRBO-TVP). Смесь клеток и ДНК выдерживают на льду в течение 5 минут, переносят в -80°C на 5 минут и инкубируют на водяной бане при 37°C в течение 5 минут. Клетки, обработанные замораживанием-размораживанием, затем разводят в 1 мл среды LB и встряхивают на качалке в течение 2-4 часов при комнатной температуре. Затем аликвоту 200 мкл смеси клеток и ДНК наносят на чашки с агаром LB с соответствующими антибиотиками (10 мкг/мл рифампицина, 25 мкг/мл гентамицина и 50 мкг/мл канамицина можно использовать как для трансформации pFECT-TVP, так и для трансформации pTRBO-TVP) и инкубируют при 28°C в течение двух дней. Полученные трансформированные колонии затем собирают и культивируют в аликвотах по 6 мл среды LB с соответствующими антибиотиками для анализа трансформированной ДНК и приготовления исходных растворов глицерина из трансформированных клеток GV3101.

В некоторых вариантах осуществления временную трансформацию тканей растений, например листьев табака, можно проводить с помощью инъекции в листья с помощью шприца на 3 мл без иглы. В одном иллюстративном примере трансформированные клетки GV3101 наносят штрихом на чашку с LB с соответствующими антибиотиками (как описано выше) и инкубируют при 28°C в течение двух дней. Колонию трансформированных клеток GV3101 инокулируют в 5 мл среды LB-MESA (среда LB с добавлением 10 мМ MES и 20 мкМ ацетосирингона) и тех же антибиотиков, что описаны выше, и выращивают в течение ночи при 28°C. Клетки ночной культуры собирают центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут и ресуспендируют в индукционной среде (10 мМ MES, 10 мМ $MgCl_2$, 100 мкМ ацетосирингон) при конечной OD600, равной 1,0. Затем клетки инкубируют в индукционной среде от 2 часов до ночи при комнатной температуре, после чего они готовы к временной трансформации листьев табака. Обработанные клетки можно инфильтрировать в нижнюю часть прикрепленных листьев растений Nicotiana benthamiana путем инъекции с помощью шприца объемом 3 мл без прикрепленной иглы.

В некоторых вариантах осуществления временную трансформацию можно осуществить путем трансфекции одной популяции клеток GV3101 с помощью pFECT-TVP или pTRBO-TVP и другой популяции с помощью pFECT-P19, смешивая две

клеточные популяции вместе в равных количествах для инфильтрации листьев табака путем инъекции шприцем на 3 мл.

Стабильная интеграция полинуклеотида, способного кодировать TVP, также возможна в соответствии с настоящим изобретением, например, ОРС экспрессии TVP также может быть интегрирована в геном растения с использованием технологии стабильной трансформации растений, и, следовательно, TVP могут стабильно экспрессироваться в растениях и защищать трансформированные растения из поколения в поколение. Для стабильной трансформации растений вектор экспрессии TVP может быть кольцевым или линейным. ОРС экспрессии TVP, кассета экспрессии TVP и/или вектор с полинуклеотидом, кодирующим TVP для стабильной трансформации растений, должны быть тщательно разработаны для оптимальной экспрессии в растениях на основе того, что известно специалистам в данной области техники, и/или с помощью средств предиктивного конструирования векторов, таких как Gene Designer 2.0 (Atum Bio); VectorBuilder (Cyagen); средство просмотра SnapGene®; GeneArtTM Plasmid Construction Service (Thermo-Fisher Scientific) и/или другие коммерчески доступные сервисы по конструированию плазмид. См. Tolmachov, Designing plasmid vectors. Methods Mol Biol. 2009; 542:117-29. Экспрессия TVP обычно контролируется промотором, который способствует транскрипции в некоторых или во всех клетках трансгенного растения. Промотор может представлять собой сильный промотор растительного вируса, например, конститутивный промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты (CaMV); это также может быть сильный растительный промотор, например, промотор гидропероксидлиазы (pHPL) из Arabidopsis thaliana; промотор полиубиквитина Glycine max (Gmubi) из сои; промоторы убиквитина из разных видов растений (рис, кукуруза, картофель и т. д.) и т. д. Терминатор транскрипции растений часто возникает после стоп-кодона ОРС, чтобы остановить РНК-полимеразу и транскрипцию мРНК. Для оценки экспрессии TVP в вектор экспрессии TVP может быть включен репортерный ген, например, ген бета-глюкуронидазы (GUS) для анализа окрашивания GUS, ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) для обнаружения зеленой флуоресценции в УФ-свете и т. д. Для селекции трансформированных растений селективный маркерный ген обычно включают в вектор экспрессии TVP. В некоторых вариантах осуществления продукт экспрессии маркерного гена может придавать трансформированному растению устойчивость к определенным антибиотикам, например, канамицину, гигромицину и т. д., или специфическому гербициду, например, глифосату и т. д. Если для трансформации растений используют технологию агроинфекции, последовательности левой и правой границ Т-ДНК также включают в вектор экспрессии TVP для транспорта части Т-ДНК в растение.

Сконструированный вектор экспрессии TVP может быть трансфецирован в клетки или ткани растения с использованием многих технологий трансфекции. Агроинфекция является очень популярным способом трансформации растения с использованием штамма Agrobacterium tumefaciens или штамма Agrobacterium rhizogenes. Технология бомбардировки частицами (также называемая Gene Gun или Biolistics) также является

очень распространенным методом трансфекции растений. Другие менее распространенные методы трансфекции включают электропорацию тканей, нитевидные кристаллы карбида кремния, прямую инъекцию ДНК и т. д. После трансфекции трансфицированные клетки или ткани растения помещают в среду для регенерации растений для регенерации успешно трансфицированных клеток или тканей растений в трансгенные растения.

Оценка трансформированного растения может быть выполнена по уровню ДНК, РНК и белка. Стабильно трансформированное растение можно оценивать на всех этих уровнях, а временно трансформированное растение обычно оценивают только по уровню белка. Чтобы убедиться, что ОРС экспрессии TVP интегрируется в геном стабильно трансформированного растения, геномную ДНК можно экстрагировать из стабильно трансформированных тканей растения и проанализировать с помощью ПЦР или Саузерн-блоттинга. Экспрессию TVP в стабильно трансформированном растении можно оценить по уровню РНК, например, анализируя суммарную мРНК, выделенную из тканей трансформированного растения, с помощью нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР. Экспрессию TVP в трансформированном растении также можно оценить непосредственно по уровню белка. Существует множество способов оценки экспрессии TVP в трансформированном растении. Если репортерный ген включен в ОРС экспрессии TVP, может быть проведен анализ репортерного гена, например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать анализ окрашивания GUS для экспрессии репортерного гена GUS, анализ обнаружения зеленой флуоресценции для экспрессии репортерного гена GFP, анализ люциферазы для экспрессии репортерного гена люциферазы и/или другие репортерные методики.

В некоторых вариантах осуществления общий белок можно экстрагировать из тканей трансформированного растения для прямой оценки экспрессии TVP с использованием анализа Бредфорда для оценки уровня общего белка в образце.

В некоторых вариантах осуществления для качественной или количественной оценки TVP в экстрагированном образце общего белка из тканей трансформированного растения можно применять технологию аналитической ВЭЖХ-хроматографии, методику вестерн-блоттинга или анализ нИФА. Экспрессия TVP также может быть оценена с использованием экстрагированного образца общего белка из тканей трансформированного растения в биологическом анализе насекомого, например, в некоторых вариантах осуществления ткань трансформированного растения или само трансформированное растение целиком можно использовать в биологическом анализе насекомого для оценки экспрессии TVP и его способности обеспечивать защиту растения.

Иллюстративные трансгенные растения

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична

аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения,

семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP, или полинуклеотид, или комплементарная ему последовательность содержит по меньшей мере два или более TVP.

В некоторых вариантах осуществления растение, ткань растения, клетка растения, семя растения или их часть по настоящему изобретению могут содержать один или несколько TVP или кодирующий их полинуклеотид, причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7

представляет собой G или отсутствует; при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

Подтверждение успешной трансформации с помощью TVP

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают различными методами, такими как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ - это быстрый метод скрининга трансформированных клеток, тканей или побегов на наличие встроенного гена на более ранней стадии перед пересадкой в почву (Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). ПЦР проводят с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных для представляющего интерес гена, или на основании вектора Agrobacterium и т. д.

Трансформация растений может быть подтверждена анализом Саузерн-блоттинга геномной ДНК (Sambrook and Russell, 2001, supra). Как правило, общую ДНК экстрагируют из трансформированного растения, расщепляют соответствующими ферментами рестрикции, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Затем мембрану или «блот» исследуют, например, с помощью фрагмента целевой ДНК ^{32}P с радиоактивной меткой, чтобы подтвердить интеграцию введенного гена в геном растения в соответствии со стандартными методами (Sambrook and Russell, 2001, см. выше).

В анализе нозерн-блоттинг РНК выделяют из определенных тканей трансформированного растения, фракционируют в формальдегид-агарозном геле и наносят на нейлоновый фильтр в соответствии со стандартными процедурами, обычно используемыми в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, выше). Экспрессию РНК, кодируемой полинуклеотидом, кодирующим TVP, затем тестируют путем гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из TVP, способами, известными в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, выше).

Вестерн-блоттинг, биохимические анализы и т.п. можно проводить на трансгенных растениях для подтверждения присутствия белка, кодируемого геном TVP, с помощью стандартных процедур (Sambrook and Russell, 2001, выше) с использованием антител, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими на TVP.

Для определения успешности трансформации растений был разработан ряд маркеров, например устойчивости к хлорамфениколу, аминогликозиду G418, гигромицину и т.п. Другие гены, которые кодируют продукт, участвующий в метаболизме хлоропластов, также могут быть использованы в качестве селективных маркеров. Например, особое применение могут найти гены, обеспечивающие устойчивость растений к гербицидам, таким как глифосат, бромоксинил или имидазолинон. Сообщалось о таких генах (Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (ген нитрилазы устойчивости к

бромоксинам) и Sathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (ген устойчивости к имидазолинону AHAS). Кроме того, описанные в данном документе гены можно использовать в качестве маркеров для оценки трансформации бактериальных, дрожжевых или растительных клеток. Способы обнаружения присутствия трансгена в растении, органе растения (например, листьях, стеблях, корнях и т. д.), семени, клетке растения, пропагуле, зародыше или их потомстве хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления присутствие трансгена выявляют путем тестирования на пестицидную активность.

Фертильные растения, экспрессирующие вариант полинуклеотида TVP и/или U1-агатоксин-Ta1b, можно тестировать на пестицидную активность, и растения, демонстрирующие оптимальную активность, отбирают для дальнейшей селекции. В данной области техники доступны способы определения активности вредителей. Как правило, белок смешивают и используют в анализах кормления. См., например Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

В некоторых вариантах осуществления оценка успеха процедуры временной трансфекции может быть определена на основе экспрессии репортерного гена, например, GFP. В некоторых вариантах осуществления GFP можно обнаружить в УФ-излучении в листьях табака, трансформированных векторами FECT и/или TRBO.

В некоторых вариантах осуществления экспрессию TVP можно количественно оценить в растении (например, в табаке). Типичная процедура, которая иллюстрирует количественную оценку TVP в растении табака, выглядит следующим образом: 100-мг диски трансформированной ткани листьев собирают путем перфорации листьев большим отверстием наконечника пипетки на 1000 мкл. Собранную ткань листа помещают в микропробирку объемом 2 мл с мелющими шарами из нержавеющей стали диаметром 5/32 дюйма и замораживают при температуре -80°C в течение 1 часа, а затем гомогенизируют с использованием высокопроизводительного гомогенизатора Troemner-Talboys. Затем в пробирку добавляют 750 мкл ледяных экстракционных растворов TSP-SE1 (50 мМ раствора фосфата натрия, разбавленная 1:100 смесь ингибиторов протеазы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ DIECA, 8% PVPP, pH 7,0) и перемешивают на вортексе. Затем микропробирку оставляют при комнатной температуре на 15 минут, а затем центрифугируют при 16000 g в течение 15 минут при 4°C; отбирают 100 мкл полученного супернатанта и загружают в предварительно заполненную Sephadex G-50 колонку в 0,45-мкм микротитрационный планшет с фильтром Millipore MultiScreen с пустым приемным микротитрационным планшетом Costar на дне. Затем планшеты для микротитрования центрифугируют при 800 g в течение 2 минут при 4°C. Полученный раствор фильтрата, называемый в данном случае экстрактом общего растворимого белка (экстрактом ОРБ) листьев табака, затем готов для количественного анализа.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию общего растворимого белка в экстракте ОРБ можно оценить с помощью анализа белка Pierce Coomassie Plus. Стандарты белка БСА с известными концентрациями можно использовать для построения

стандартной кривой для количественного определения белка. Например, 2 мкл каждого экстракта ОРБ можно смешать с 200 мкл хромогенного реагента (реагент CPPA) из наборов для анализа белка Coomassie Plus и инкубировать в течение 10 минут. Затем можно оценить хромогенную реакцию, считывая OD595 с помощью планшет-ридера SpectroMax-M2 с использованием SoftMax Pro в качестве контрольного программного обеспечения. Концентрации общих растворимых белков могут составлять около 0,788 ± 0,20 мкг/мкл или около 0,533 ± 0,03 мкг/мкл в экстракте ОРБ из растений, трансформированных с помощью FECT и TRBO, соответственно, и результаты могут быть использованы для расчета процентного содержания экспрессированного варианта пептида U1-агатоксин-Ta1b в ОРБ (%ОРБ) для анализа нИФА.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать непрямой анализ ИФА (нИФА) для количественной оценки содержания TVP в листьях табака, временно трансформированных системами экспрессии FECT и/или TRBO. Иллюстративный пример использования нИФА для количественного определения TVP выглядит следующим образом: 5 мкл экстракта ОРБ листьев разбавляют 95 мкл раствора CB2 (Immunochemistry Technologies) в лунке 96-луночного планшета Immulon 2HD, при необходимости проводят серийные разведения; белкам листьев, полученным из образцов экстракта, затем дают покрыть стенки лунки в течение 3 часов в темноте при комнатной температуре, после чего раствор CB2 удаляют; каждую лунку дважды промывают 200 мкл ФСБ (Gibco); в каждую лунку добавляют по 150 мкл блокирующего раствора (блок БСА в ФБС с 5% обезжиренного сухого молока) и инкубируют в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре; после удаления блокирующего раствора лунки промывают ФСБ, добавляют 100 мкл первичных антител, направленных против TVP (нестандартные антитела коммерчески доступны от ProMab Biotechnologies, Inc.; GenScript®; или получены с использованием знаний, легко доступных специалистам в данной области техники); в каждую лунку вносят антитела, разведенные 1:250 в блокирующем растворе, и инкубируют 1 час в темноте при комнатной температуре; первичное антитело удаляют и каждую лунку промывают ФСБ 4 раза; в каждую лунку добавляют 100 мкл вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (т.е. антитела, направленные против видов-хозяев, используемые для получения первичных антител, используемые в разведении 1:1000 в блокирующем растворе) и инкубируют в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре; вторичное антитело удаляют и лунки промывают 100 мкл ФСБ; раствор субстрата (смесь 1:1 раствора A и раствора B субстрата пероксидазы ABTS, KPL) добавляют в каждую лунку, и хромогенная реакция продолжается до тех пор, пока не появится достаточное окрашивание; в каждую лунку добавляют по 100 мкл стоп-раствора пероксидазы для остановки реакции; светопоглощение каждой реакционной смеси в планшете считывается при 405 нм с помощью планшетного ридера SpectroMax-M2 с использованием SoftMax Pro в качестве контрольного программного обеспечения; серийно разведенные образцы чистых TVP с известными концентрациями могут быть обработаны таким же образом, как описано выше, в анализе нИФА для создания

стандартной кривой массового поглощения для количественного анализа. Экспрессированный TVP может быть обнаружен с помощью нИФА в концентрации около 3,09 ± 1,83 нг/мкл в экстрактах ОРБ из листьев табака, трансформированного FECT; и около 3,56 ± 0,74 нг/мкл в экстракте ОРБ из листьев табака, трансформированного TRBO. Альтернативно, экспрессированный TVP может составлять около 0,40% общего растворимого белка (%ОРБ) для растений, трансформированных FECT, и около 0,67% ОРБ в растениях, трансформированных TRBO.

КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

Используемые в данном документе термины «композиция» и «составы» используются взаимозаменяемо.

Используемые в данном документе термины «об./об.» или «% об./об.» или «объем на объем» относятся к объемной концентрации раствора («об./об.» означает объем на объем). В данном документе можно использовать об./об., когда оба компонента раствора являются жидкостями. Например, если 50 мл ингредиента X разбавить 50 мл воды, получится 50 мл ингредиента X в общем объеме 100 мл; следовательно, это можно выразить как «ингредиент X составляет 50% об./об.». Процент объема на объем (% об./об.) рассчитывают следующим образом: (объем растворенного вещества (мл)/объем раствора (100 мл)); например, % об./об.=мл растворенного вещества/100 мл раствора.

Используемые в данном документе термины «масс./масс.» или «% масс./масс.», или «масса на массу», или «масс./масс.», или «% масс./масс.» относятся к массовой концентрации состава или раствора, т.е. по массе («масс./масс.» означает «масса на массу»). В данном документе масс./масс. выражает количество граммов (г) компонента в 100 г раствора или смеси. Например, смесь, состоящая из 30 г ингредиента X и 70 г воды, будет выражена как «ингредиент X составляет 30% по массе». Процент массы на массу (% масс./масс.) рассчитывают следующим образом: (масса растворенного вещества (г)/масса раствора (г)) x 100; или (масса растворенного вещества (г)/масса раствора (г)) x 100.

Используемые в данном документе термины «масс./об.» или «% масс./об.», или «масса на объем» относятся к массовой концентрации раствора, т. е. к проценту массы в объеме («масс./об.» означает массу на единицу объема). В данном документе масс./об. выражает количество граммов (г) компонента в 100 мл раствора. Например, если 1 г ингредиента X используют для получения общего объема 100 мл, то получается «1% масс./об. раствора ингредиента X». Процент массы на единицу объема (% масс./об.) рассчитывают следующим образом: (масса растворенного вещества (г)/объем раствора (мл)) x 100.

Любой из вышеупомянутых вариантов полипептидов U1-агатоксин-Ta1b (TVP) или TVP-инсектицидных белков, описанных в настоящем документе (например, приведенных в Таблице 1), можно применять для создания композиции, при этом указанная композиция состоит по меньшей мере из одного TVP и/или по меньшей мере одного TVP-инсектицидного белка.

В некоторых вариантах осуществления композиция может состоять из TVP-

инсектицидного белка и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, обладающего инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких видов насекомых, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в Таблице 1, или его фармацевтически приемлемой соли и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из одного или нескольких TVP, описанных в Таблице 1, и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, обладающего инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких видов насекомых, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, или его фармацевтически приемлемой соли и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, при этом указанный TVP имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2-15, 49-53 и 77-110, и эксципиента.

Композиции, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли, например, агрохимические композиции, могут включать, помимо прочего, аэрозоли и/или аэрозольные продукты, например спреи, фумиганты, порошки, пыль и/или газы; протравки семян; пероральные препараты (например, корм для насекомых и т. д.); трансгенные организмы, экспрессирующие и/или продуцирующие TVP, TVP-инсектицидный белок и/или ОРС TVP (временно и/или стабильно), например, растение или животное.

Композиция может быть приготовлена в виде порошка, пыли, пеллет, гранул, аэрозоля, эмульсии, коллоида, раствора и т.п. и может быть приготовлена такими обычными способами, как высушивание, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, осаждение или концентрация клеточной культуры, содержащей полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат по меньшей мере один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации от около 1% до около 99% по массе.

В некоторых вариантах осуществления пестицидные композиции, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем приготовления либо TVP, TVP-инсектицидного белка, либо их фармацевтически приемлемой соли с желаемым сельскохозяйственно приемлемым носителем. Композиции могут быть приготовлены перед введением в соответствующих средствах, таких как лиофилизированные, сублимированные, высушенные формы, или в водном носителе, среде или подходящем разбавителе, таком как физиологический раствор и/или другой буфер. В некоторых вариантах осуществления приготовленные композиции могут быть в форме пыли или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или воде, или масляно-водных эмульсиях, или в виде смачивающегося порошка, или в комбинации с любым другим материалом-носителем, подходящим для сельскохозяйственного применения. Подходящие сельскохозяйственные носители могут быть твердыми или жидкими и хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления составы могут быть смешаны с одним или несколькими твердыми или жидкими адъювантами и приготовлены различными способами, например, путем гомогенного перемешивания, смешивания и/или перетирания пестицидной композиции с подходящими адъювантами с использованием обычных способов приготовления. Подходящие составы и способы применения описаны в патенте США № 6468523, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP-инсектицидного белка и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления композиция может состоять из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента.

Распыляемые композиции

Примеры распыляемых продуктов по настоящему изобретению могут включать составы для распыления в полевых условиях для использования в сельском хозяйстве и спреи для использования внутри помещений в жилых или коммерческих помещениях. В некоторых вариантах осуществления остаточные спреи или спреи для распыления в пространстве, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли, можно использовать для уменьшения или уничтожения насекомых-вредителей во внутренних помещениях.

Распыление на поверхности внутри помещений (SSI) представляет собой метод нанесения распыляемого объема инсектицида с переменным объемом на поверхности внутри помещений, где находятся переносчики, например, на стенах, окнах, полах и потолках. Основной целью распыляемого объема с переменным объемом является сокращение продолжительности жизни насекомого-вредителя (например, мухи, блохи, клеща или комара-переносчика) и, таким образом, уменьшение или прекращение передачи заболевания. Вторичное воздействие заключается в снижении плотности насекомых-вредителей в зоне обработки. SSI можно использовать в качестве способа борьбы с заболеваниями, переносчиками которых являются насекомые-вредители, такими как болезнь Лайма, сальмонелла, вирус Чикунгунья, вирус Зика и малярия, а также для борьбы с паразитами, переносимыми насекомыми-переносчиками, такими как лейшманиоз и болезнь Шагаса. Многие комары-переносчики, являющиеся переносчиками вирусов Зика, Чикунгунья и малярии, включают эндофильных комаров-переносчиков, которые покоятся в домах после употребления кровью. Эти комары особенно восприимчивы к борьбе путем распыления на поверхности внутри помещений (SSI) распыляемой композиции, состоящей из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента. Как следует из названия, SSI предполагает нанесение состава на стены и другие поверхности дома с остаточным инсектицидом.

В одном варианте осуществления композиция, состоящая из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, уничтожает насекомых-вредителей, которые вступают в контакт с этими поверхностями. SSI напрямую не защищает людей от укусов комаров. Скорее, оно обычно уничтожает насекомых-вредителей после того, как они напились крови, если они покоятся на опрысканной поверхности. Таким образом, SSI предотвращает передачу инфекции другим людям. Чтобы быть эффективным, SSI должно применяться к очень большой доле домохозяйств в районе (обычно более 40-80 процентов). Следовательно, спреи в соответствии с изобретением, обладающие хорошей остаточной эффективностью и приемлемым запахом, особенно подходят в качестве компонента комплексных решений по борьбе с насекомыми-вредителями-переносчиками.

В отличие от SSI, которое требует, чтобы активный TVP или TVP-инсектицидный белок был связан с поверхностями жилых помещений, такими как стены или потолки, как, например, с краской, продукты для распыления в пространстве по изобретению основаны на получении большого количества количество мелких капель инсектицида, предназначенных для распространения в объеме воздуха за определенный период времени. Когда эти капли воздействуют на целевое насекомое-вредителя, они доставляют эффективную для нокдауна дозу TVP или TVP-инсектицидного белка, эффективную для борьбы с насекомым-вредителем. Традиционные способы создания распыления в пространстве включают термическое окуривания (при котором образуется плотное облако композиции, состоящей из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли, создающее вид густого тумана) и метод сверхмалого объема (ULV, англ.: Ultra Low Volume), при котором капли образуются с помощью холодной механической машины, генерирующей аэрозоль. Также можно использовать готовые к использованию аэрозоли, такие как аэрозольные баллончики.

Поскольку одновременно можно обрабатывать большие площади, описанный выше способ является очень эффективным способом быстрого сокращения популяции летающих насекомых-вредителей в определенном районе. И, поскольку остаточная активность после применения очень ограничена, его необходимо повторять с интервалом в 5-7 дней, чтобы он был полностью эффективным. Этот способ может быть особенно эффективен в эпидемических ситуациях, когда требуется быстрое сокращение численности насекомых-вредителей. Таким образом, его можно использовать в городских кампаниях по борьбе с лихорадкой Денге.

Эффективное распыления в пространстве обычно зависит от следующих конкретных принципов. Насекомые-мишени обычно летят сквозь облако спрея (или иногда на них воздействуют, когда они покоятся на открытых поверхностях). Поэтому эффективность контакта между каплями спрея и насекомыми-мишенями имеет решающее значение. Это достигается за счет того, что капли спрея остаются в воздухе в течение оптимального периода времени и содержат правильную дозу инсектицида. Эти две проблемы в значительной степени решаются за счет оптимизации размера капель. Если капли слишком большие, они падают на землю слишком быстро и не проникают в растительность или другие препятствия, встречающиеся во время применения (ограничивая эффективную область применения). Если одна из этих больших капель попадает в отдельное насекомое, то это также является «излишним», потому что на каждое насекомое будет доставлена высокая доза. Если капли слишком малы, то они могут либо не оседать на насекомом-мишени (отсутствие столкновения) из-за аэродинамики, либо могут быть унесены вверх в атмосферу конвекционными потоками. Оптимальный размер капель для распыления в пространстве - это капли со средним объемным диаметром (VMD, англ.: Volume Median Diameter) 10-25 микрон.

В некоторых вариантах осуществления распыляемая композиция может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до

около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления распыляемая композиция может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Пены

Активные композиции по настоящему изобретению, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, могут быть доступны в виде распыляемого продукта для аэрозольного применения, включая применение в виде аэрозольной пены. Баллоны под давлением являются типичным средством для образования аэрозолей. Используют аэрозольный пропеллент, совместимый с TVP или TVP-инсектицидным белком. Предпочтительно использовать пропеллент типа сжиженного газа.

Подходящие пропелленты включают сжатый воздух, двуокись углерода, бутан и азот. Концентрация пропеллента в композиции активного соединения составляет от около 5 процентов до около 40 процентов по массе пиридиновой композиции, предпочтительно от около 15 до около 30 процентов по массе композиции, состоящей из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента.

В одном варианте осуществления составы, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли, могут также включать один или несколько пенообразователей. Пенообразователи, которые можно использовать, включают лауретсульфат натрия, кокамид ДЭА и кокамидопропилбетаин. Предпочтительно лауретсульфат натрия, кокамид ДЭА и кокамидопропил используют в комбинации. Концентрация пенообразователя(ей) в композиции активного соединения составляет от около 10 процентов до около 25 процентов по массе, более предпочтительно от 15 до 20 процентов по массе композиции.

Когда такие препараты используют в аэрозольных применениях, не содержащих пенообразователей, активные композиции по настоящему изобретению можно использовать без необходимости смешивания непосредственно перед применением. Однако аэрозольные составы, содержащие пенообразователи, требуют смешивания (т.е. встряхивания) непосредственно перед применением. Кроме того, если составы, содержащие пенообразователи, используют в течение продолжительного времени, может потребоваться их дополнительное перемешивание через определенные промежутки времени во время использования.

В некоторых вариантах осуществления аэрозольная пена может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления аэрозольная пена может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Составы для сжигания

В некоторых вариантах осуществления площадь жилища также может быть обработана активной композицией с TVP или TVP-инсектицидным белком с использованием состава для сжигания, такого как свеча, дымовая спираль или кусочек благовония, содержащего композицию. Например, композиция может быть включена в состав бытовых продуктов, таких как «нагреваемые» освежители воздуха, в которых инсектицидные композиции высвобождаются при нагревании, например, электрическом или при сжигании. Композиции активного соединения по настоящему изобретению, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли, могут быть доступны в виде распыляемого продукта в виде аэрозоля, противомоскитной спирали и/или испарителя или туманообразователя.

В некоторых вариантах осуществления состав для сжигания может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления состав для сжигания может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Обработка ткани

В некоторых вариантах осуществления ткани и одежда могут быть изготовлены с использованием пестицидно-эффективной композиции, состоящей из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента. В некоторых вариантах осуществления концентрация TVP или TVP-инсектицидного белка в полимерном материале, волокне, пряже, переплетении, сетке или субстрате, описанных в настоящем документе, может варьироваться в относительно широком диапазоне концентраций, например, от 0,05 до 15 процентов по массе, предпочтительно от 0,2 до 10 процентов по массе, более предпочтительно от 0,4 до 8 процентов по массе, особенно от 0,5 до 5, например, от 1 до 3 процентов по массе.

Точно так же концентрация композиции, состоящей из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента (будь то для обработки поверхностей или для покрытия волокна, пряжи, сетки, переплетения), может варьироваться в относительно широком диапазоне концентраций, например, от 0,1 до 70 процентов по массе, например, от 0,5 до 50 процентов по массе, предпочтительно от 1 до 40 процентов по массе, более предпочтительно от 5 до 30 процентов по массе, особенно от 10 до 20 процентов по массе.

Концентрация TVP или TVP-инсектицидного белка может быть выбрана в соответствии с областью применения таким образом, чтобы удовлетворялись требования, касающиеся нокдаун-эффективности, долговечности и токсичности. Также можно адаптировать свойства материала, и таким образом можно получить текстильные ткани, изготовленные по индивидуальному заказу.

Соответственно, эффективное количество TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли может зависеть от конкретного способа применения,

насекомого-вредителя, борьба с которым наиболее желательна, и среды, в которой TVP или TVP-инсектицидный белок будет использованы. Следовательно, эффективного количества TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли достаточно для достижения борьбы с насекомыми-вредителями.

В некоторых вариантах осуществления средство для обработки ткани может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления средство для обработки ткани может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Составы для обработки поверхности

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции или составы, состоящие из TVP и эксципиента или состоящие из TVP-инсектицидного белка и эксципиента, для покрытия стен, полов и потолков внутри зданий, а также для покрытия субстрата или не-живого материала. Композиции по настоящему изобретению, состоящие из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, могут быть приготовлены с использованием известных способов для этой цели. Препараты композиций, состоящих из TVP-инсектицидного белка и эксципиента, могут быть составлены таким образом, чтобы они также содержали связующее вещество для облегчения связывания соединения с поверхностью или другим субстратом. Агенты, применимые для связывания, известны в данной области техники и, как правило, имеют полимерную форму. Тип связующего вещества, подходящего для композиций, наносимых на поверхность стены, обладающей определенной пористостью и/или характеристиками связывания, будет отличаться от типа волокна, пряжи, переплетения или сетки, поэтому специалист в данной области техники, основываясь на известных методах, должен выбрать подходящее связующее вещество, исходя из желаемой поверхности и/или субстрата.

Типичными связующими веществами являются поливиниловый спирт, модифицированный крахмал, поливинилакрилат, полиакрил, сополимер поливинилацетата, полиуретан и модифицированные растительные масла. Подходящие связующие вещества могут включать латексные дисперсии, полученные из широкого спектра полимеров и сополимеров и их комбинаций. Подходящие латексы для использования в качестве связующих веществ в композициях по изобретению включают полимеры и сополимеры стирола, алкилстиролов, изопрена, бутадиена, акрилонитрила, низших алкилакрилатов, винилхлорида, винилиденхлорида, виниловых эфиров низших карбоновых кислот и альфа-, бета-этиленненасыщенных карбоновых кислот, включая полимеры, содержащие сополимеризованные в них три или более различных видов мономеров, а также постдиспергированные суспензии силиконов или полиуретанов. Также подходящим может быть полимер политетрафторэтилена (ПТФЭ) для связывания активного ингредиента с другими поверхностями.

В некоторых вариантах осуществления композиция для обработки поверхности может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления композиция для обработки поверхности может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Диспергаторы

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления инсектицидный состав по настоящему изобретению может состоять из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, разбавителя или носителя (например, такого как вода), полимерного связующего вещества, и/или дополнительных компонентов, таких как диспергатор, полимеризующий агент, эмульгатор, загуститель, спирт, отдушка или любые другие инертные эксципиенты, используемые в приготовлении распыляемых инсектицидов, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления композиция, состоящая из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, может быть приготовлена в ряде различных форм или типов составов, таких как суспензии или суспензии капсул. И специалист в данной области техники может приготовить соответствующую композицию на основе свойств конкретного TVP или TVP-инсектицидного белка, его применения, а также типа его применения. Например, TVP или TVP-инсектицидный белок, используемый в способах, вариантах осуществления и других аспектах настоящего изобретения, может быть инкапсулирован в виде суспензии или состава суспензии капсул. Инкапсулированный TVP или TVP-инсектицидный белок может обеспечить улучшенную стойкость к смыванию, а также более длительный период активности. Состав может быть на органической основе или на водной основе, предпочтительно на водной основе.

В некоторых вариантах осуществления диспергатор может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления диспергатор может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Микрокапсулирование

Микрокапсулированный TVP или TVP-инсектицидный белок, применимый для использования в композициях и способах по настоящему изобретению, можно получить любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, ранее были разработаны различные способы микроинкапсулирования материала. Эти процессы можно разделить на три категории: физические методы, фазовое разделение и межфазная реакция. В категории физических методов материал стенки микрокапсулы и частицы сердцевины физически соединяются вместе, и материал стенки обтекает частицу ядра,

образуя микрокапсулу. В категории разделения фаз микрокапсулы образуются путем эмульгирования или диспергирования материала ядра в несмешиваемой непрерывной фазе, в которой материал стенки растворяется и вызывает физическое отделение от непрерывной фазы, например, путем коацервации, и осаждение вокруг частиц ядра. В категории межфазных реакций микрокапсулы образуются путем эмульгирования или диспергирования материала ядра в несмешивающейся сплошной фазе, а затем на поверхности частиц ядра инициируется реакция межфазной полимеризации. Концентрация TVP или TVP-инсектицидного белка, присутствующего в микрокапсулах, может варьировать от 0,1 до 60% по массе микрокапсулы.

В некоторых вариантах осуществления микрокапсула может содержать TVP или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

В некоторых вариантах осуществления микрокапсула может содержать TVP-инсектицидный белок или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от около 0,005% масс. до около 99% масс.

Наборы, составы, диспергаторы и их ингредиенты

Состав, используемый в композициях (состоящих из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента), способах, вариантах осуществления и других аспектах по настоящему изобретению, может быть получен путем смешивания всех ингредиентов вместе с водой и, необязательно, с использованием подходящих смешивающих и/или диспергирующих заполнителей. Обычно такой состав получают при температуре от 10 до 70°C, предпочтительно от 15 до 50°C, более предпочтительно от 20 до 40°C. Как правило, возможен состав, содержащий один или более из (A), (B), (C) и/или (D), где можно использовать: TVP, TVP-инсектицидный белок или их фармацевтически приемлемую соль (в качестве пестицида) (A); твердый полимер (B); необязательные дополнительные добавки (D); и диспергировать их в водном компоненте (C). Если в композиции по настоящему изобретению присутствует связующее вещество (состоящее из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли и эксципиента), предпочтительно использовать дисперсии полимерного связующего вещества (B) в воде, а также водные составы TVP или TVP-инсектицидного белка (A) в воде, которые ранее были отдельно приготовлены. Такие отдельные составы могут содержать дополнительные добавки для стабилизации (A) и/или (B) в соответствующих составах и являются коммерчески доступными. На второй стадии процесса добавляют такие исходные составы и необязательно дополнительную воду (компонент (C)). Также возможны комбинации вышеупомянутых ингредиентов на основе приведенной выше схемы, например, с использованием предварительно приготовленной дисперсии (A) и/или (B) и смешиванием ее с твердым веществом (A) и/или (B). Дисперсия полимерного связующего вещества (B) может быть предварительно приготовленной дисперсией, уже приготовленной производителем химических веществ.

Кроме того, в объем настоящего изобретения также входит использование

дисперсий «ручной работы», то есть дисперсий, изготовленных конечным пользователем в небольших масштабах. Такие дисперсии могут быть приготовлены путем приготовления смеси примерно 20 процентов связующего вещества (B) в воде, нагревания смеси до температуры от 90°C до 100°C и интенсивного перемешивания смеси в течение нескольких часов. Композицию можно изготовить в виде конечного продукта, чтобы конечный пользователь мог легко использовать ее в способе по настоящему изобретению. И, конечно же, также возможно изготовить концентрат, который конечный пользователь может разбавить дополнительным количеством воды (C) до желаемой концентрации для использования.

В одном варианте осуществления композиция (состоящая из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента), подходящая для SSI-применения, или состав для покрытия (состоящий из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли и эксципиента), содержат активный ингредиент и носитель, такой как вода, а также могут иметь один или несколько вспомогательных компонентов, выбранных из диспергатора, смачивателя, антифриза, загустителя, консерванта, эмульгатора и связующего веществ или липкого вещества.

В некоторых вариантах осуществления типичный твердый состав TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли обычно измельчают до желаемого размера частиц, например, распределение размера частиц d(0,5) обычно составляет от 3 до 20, предпочтительно от 5 до 15, особенно от 7 до 12 мкм.

Кроме того, можно доставить состав конечному пользователю в виде набора, включающего по меньшей мере первый компонент, состоящий из TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли (A); и второго компонента, содержащего по меньшей мере одно полимерное связующее вещество (B). Дополнительные добавки (D) могут быть третьим отдельным компонентом набора или могут быть уже смешаны с компонентами (A) и/или (B). Конечный пользователь может приготовить состав для использования, просто добавив воду (C) к компонентам набора и перемешав. Компоненты набора также могут быть составами в воде. Конечно, можно комбинировать водную композицию одного из компонентов с сухой композицией другого компонента(ов). Например, набор может состоять из одного состава TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли (A) и необязательно воды (C); и второго, отдельного состава по меньшей мере из одного полимерного связующего (B), воды в качестве компонента (C) и необязательно компонентов (D).

Концентрации компонентов (A), (B), (C) и необязательно (D) будут выбраны специалистом в данной области техники в зависимости от технологии, используемой для покрытия/обработки. Как правило, количество TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли (A) может составлять до 50, предпочтительно от 1 до 50, например от 10 до 40, особенно от 15 до 30 процентов по массе, в расчете на массу композиции. Количество полимерного связующего вещества (B) может находиться в

диапазоне от 0,01 до 30, предпочтительно от 0,5 до 15, более предпочтительно от 1 до 10, особенно от 1 до 5 процентов по массе, в расчете на массу композиции. Если они присутствуют, то общее количество дополнительных компонентов (D) составляет от 0,1 до 20, предпочтительно от 0,5 до 15 процентов по массе в расчете на массу композиции. Подходящие количества пигментов, и/или красителей, и/или ароматизаторов, если они присутствуют, обычно составляют от 0,01 до 5, предпочтительно от 0,1 до 3, более предпочтительно от 0,2 до 2 процентов по массе в расчете на массу композиции. Типичный состав, готовый к использованию, содержит от 0,1 до 40, предпочтительно от 1 до 30 процентов компонентов (A), (B) и, необязательно, (D), остаточное количество составляет вода (C). Типичная концентрация концентрата, разбавляемого конечным пользователем, может содержать от 5 до 70, предпочтительно от 10 до 60 процентов компонентов (A), (B) и, необязательно, (D), остаточное количество составляет вода (C).

Любой из вариантов полипептида U1-агатоксин-Ta1b (TVP), описанных в настоящем документе (например, показанных в Таблице 1), и/или любой из описанных в данном документе TVP-инсектицидных белков; и/или любой из способов, относящихся к ним, могут быть использованы для создания любой из вышеупомянутых распыляемых композиций, составов и/или наборов, как описано в настоящем документе.

Витрификация

Витрификация описывает процесс, в котором кинетика реакции пептида замедляется за счет иммобилизации пептида в жесткой аморфной стекловидной матрице сахара: это приводит к резкому замедлению деградации пептида. *См.* Slade et al., Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30 (1991) 115-360. Развертывание пептидов и другие механизмы деградации зависят от молекулярной подвижности пептида; таким образом, витрификация замедляет такую деградацию. *См.* Change et al., Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?, J Pharm. Sci. 94 (2005) 1427-1444 и G.O. Poinar and R. Hess, Ultrastructure of 40-million-year-old insect tissue, Science 80 (215) (1982) 1241-1242.

Примерное описание витрификации и соображения по этому поводу при стабилизации пептидов представлено в Mensink et al., How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions**.** Eur J Pharm Biopharm. 2017 May;114:288-295; содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления TVP по настоящему изобретению может быть витрифицирован. Например, в некоторых вариантах осуществления TVP по настоящему изобретению может быть стабилизирован с помощью процесса витрификации.

В некоторых вариантах осуществления витрификация может происходить с использованием сахара. В некоторых вариантах осуществления сахар может представлять

собой трегалозу.

Трегалоза

Трегалоза представляет собой дисахарид, образованный 1,1-гликозидной связью между двумя единицами α-глюкозы.В некоторых вариантах осуществления молекулярная формула трегалозы представляет собой $C_{12}H_{22}O_{11}$; с молекулярной массой 342,3 г/моль.

Трегалоза встречается в природе в виде дисахарида, а также в виде мономера в некоторых полимерах; однако существуют некоторые изомеры трегалозы, не встречающиеся в природе. *См.* Elbein et al., New insights on trehalose: a multifunctional molecule**.** Glycobiology. 2003 Apr;13(4):17R-27R.

Было показано, что трегалоза стабилизирует белки и клетки от стрессов, таких как жара, замораживание и высыхание. *См.* K. Lippert and E. Galinski, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, 37, 61-65; J. K. Kaushik and R. Bhat, J. Biol. Chem., 2003, 278, 26458-26465; R. P. Baptista, S. Pedersen, G. J. Cabrita, D. E. Otzen, J. M. Cabral and E. P. Melo, Biopolymers, 2008, 89, 538-547; Guo et al., Nat. Biotechnol., 2000, 18, 168-171; Hengherr et al., FEBS J., 2008, 275, 281-288; Crowe et al., Science, 1984, 223, 701-703; Beattie et al., Diabetes, 1997, 46, 519-523; P. Sundaramurthi and R. Suryanarayanan, J. Phys. Chem. Lett., 2009, 1, 510-514; Duong et al., Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72, 1218-1225.

Действительно, некоторые животные накапливают трегалозу в значительных количествах в ответ на экологические стрессы, что подчеркивает способность трегалозы стабилизировать биологические молекулы. *См.* P. Westh and H. Ramlev, J. Exp. Zool., 1991, 258, 303-311 и K. A. C. Madin and J. H. Crowe, J. Exp. Zool., 1975, 193, 335-342. Кроме того, трегалоза обычно считается безопасной и используется в качестве стабилизатора в некоторых фармацевтических препаратах. См. N. K. Jain and I. Roy, Protein Sci., 2009, 18, 24-36 и S. Ohtake and Y. J. Wang, J. Pharm. Sci., 2011, 100, 2020-2053.

Применение трегалозы хорошо известно в данной области техники. Трегалоза легко доступна из коммерческих источников. Например, дигидрат D-(+)-трегалозы (продукт № T9531) и трегалоза (продукты №№ PHR1344 и 1673715) доступны от Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA).

Типичные молекулы трегалозы представлены в настоящем документе и имеют регистр. номер в Chemical Abstracts Service (CAS) № 99-20-7 (безводная) и регистр. номер CAS № 6138-23-4 (двуводная). Типичное соединение трегалозы по настоящему изобретению имеет CID PubChem № 7427.

Типичные описания использования трегалозы для стабилизации пептидов представлены в патентах США № 6165981; 6171586; 6991790; 7956028; 10273333 и 10588957; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Примеры описания получения и применения трегалозы в композициях представлены в патенте США № 7678764, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

Используемые в данном документе термины «состав» и «композиция» являются синонимами.

Диапазоны и описание компонентов состава и композиции

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению представляет собой жидкий концентрат, смачивающийся порошок или состав в виде гранул. В некоторых вариантах осуществления любой из TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, как описано в настоящем документе, можно применять в любом из составов, описанных ниже, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять в составе: смачиваемого порошка или состава в виде гранул; или жидкого концентрированного состава.

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из: (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их фармацевтически приемлемой соли; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом эксципиенты содержат, состоят по существу из или состоят из: трегалозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); мальтодекстрина и БИТ.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из трегалозы в концентрации в диапазоне от около 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% , 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% , 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% по массе от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из трегалозы в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 99,9%; от около 1% до около 99,9%; от около 2% до около 99,9%; от около 3% до около 99,9%; от около 4% до около 99,9%; от около 5% до около 99,9%; от около 6% до около 99,9%; от около 7% до около 99,9%; от около 8% до около 99,9%; от около 9% до около 99,9%; от около 10% до около 99,9%; от около 11% до около 99,9%; от около 12% до около 99,9%; от около 13% до около 99,9%; от около 14% до около 99,9%; от около 15% до около 99,9%; от около 16% до около 99,9%; от около 17% до около 99,9%; от около 18% до около 99,9%; от около 19% до около 99,9%; от около 20% до около 99,9%; от около 21% до около 99,9%; от около 22% до около 99,9%; от около 23% до около 99,9%; от около 24% до около 99,9%; от около 25% до около 99,9%; от около 26% до около 99,9%; от около 27% до около 99,9%; от около 28% до около 99,9%; от около 29% до около 99,9%; от около 30% до около 99,9%; от около 31% до около 99,9%; от около 32% до около 99,9%; от около

33% до около 99,9%; от около 34% до около 99,9%; от около 35% до около 99,9%; от около 36% до около 99,9%; от около 37% до около 99,9%; от около 38% до около 99,9%; от около 39% до около 99,9%; от около 40% до около 99,9%; от около 41% до около 99,9%; от около 42% до около 99,9%; от около 43% до около 99,9%; от около 44% до около 99,9%; от около 45% до около 99,9%; от около 46% до около 99,9%; от около 47% до около 99,9%; от около 48% до около 99,9%; от около 49% до около 99,9%; от около 50% до около 99,9%; от около 51% до около 99,9%; от около 52% до около 99,9%; от около 53% до около 99,9%; от около 54% до около 99,9%; от около 55% до около 99,9%; от около 56% до около 99,9%; от около 57% до около 99,9%; от около 58% до около 99,9%; от около 59% до около 99,9%; от около 60% до около 99,9%; от около 61% до около 99,9%; от около 62% до около 99,9%; от около 63% до около 99,9%; от около 64% до около 99,9%; от около 65% до около 99,9%; от около 66% до около 99,9%; от около 67% до около 99,9%; от около 68% до около 99,9%; от около 69% до около 99,9%; от около 70% до около 99,9%; от около 71% до около 99,9%; от около 72% до около 99,9%; от около 73% до около 99,9%; от около 74% до около 99,9%; от около 75% до около 99,9%; от около 76% до около 99,9%; от около 77% до около 99,9%; от около 78% до около 99,9%; от около 79% до около 99,9%; от около 80% до около 99,9%; от около 81% до около 99,9%; от около 82% до около 99,9%; от около 83% до около 99,9%; от около 84% до около 99,9%; от около 85% до около 99,9%; от около 86% до около 99,9%; от около 87% до около 99,9%; от около 88% до около 99,9%; от около 89% до около 99,9%; от около 90% до около 99,9%; от около 91% до около 99,9%; от около 92% до около 99,9%; от около 93% до около 99,9%; от около 94% до около 99,9%; от около 95% до около 99,9%; от около 96% до около 99,9%; от около 97% до около 99,9%; от около 98% до около 99,9% или от около 99% до около 99,9% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из трегалозы в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 99%; от около 0,1% до около 98%; от около 0,1% до около 97%; от около 0,1% до около 96%; от около 0,1% до около 95%; от около 0,1% до около 94%; от около 0,1% до около 93%; от около 0,1% до около 92%; от около 0,1% до около 91%; от около 0,1% до около 90%; от около 0,1% до около 89%; от около 0,1% до около 88%; от около 0,1% до около 87%; от около 0,1% до около 86%; от около 0,1% до около 85%; от около 0,1% до около 84%; от около 0,1% до около 83%; от около 0,1% до около 82%; от около 0,1% до около 81%; от около 0,1% до около 80%; от около 0,1% до около 79%; от около 0,1% до около 78%; от около 0,1% до около 77%; от около 0,1% до около 76%; от около 0,1% до около 75%; от около 0,1% до около 74%; от около 0,1% до около 73%; от около 0,1% до около 72%; от около 0,1% до около 71%; от около 0,1% до около 70%; от около 0,1% до около 69%; от около 0,1% до около 68%; от около 0,1% до около 67%; от около 0,1% до около 66%; от около 0,1% до около 65%; от около 0,1% до около 64%; от около 0,1% до около 63%; от около 0,1% до около 62%; от около 0,1% до около 61%; от около 0,1% до около 60%; от около 0,1% до около 59%; от около 0,1% до около 58%; от около 0,1% до около 57%; от около 0,1% до

около 56%; от около 0,1% до около 55%; от около 0,1% до около 54%; от около 0,1% до около 53%; от около 0,1% до около 52%; от около 0,1% до около 51%; от около 0,1% до около 50%; от около 0,1% до около 49%; от около 0,1% до около 48%; от около 0,1% до около 47%; от около 0,1% до около 46%; от около 0,1% до около 45%; от около 0,1% до около 44%; от около 0,1% до около 43%; от около 0,1% до около 42%; от около 0,1% до около 41%; от около 0,1% до около 40%; от около 0,1% до около 39%; от около 0,1% до около 38%; от около 0,1% до около 37%; от около 0,1% до около 36%; от около 0,1% до около 35%; от около 0,1% до около 34%; от около 0,1% до около 33%; от около 0,1% до около 32%; от около 0,1% до около 31%; от около 0,1% до около 30%; от около 0,1% до около 29%; от около 0,1% до около 28%; от около 0,1% до около 27%; от около 0,1% до около 26%; от около 0,1% до около 25%; от около 0,1% до около 24%; от около 0,1% до около 23%; от около 0,1% до около 22%; от около 0,1% до около 21%; от около 0,1% до около 20%; от около 0,1% до около 19%; от около 0,1% до около 18%; от около 0,1% до около 17%; от около 0,1% до около 16%; от около 0,1% до около 15%; от около 0,1% до около 14%; от около 0,1% до около 13%; от около 0,1% до около 12%; от около 0,1% до около 11%; от около 0,1% до около 10%; от около 0,1% до около 9%; от около 0,1% до около 8%; от около 0,1% до около 7%; от около 0,1% до около 6%; от около 0,1% до около 5%; от около 0,1% до около 4%; от около 0,1% до около 3%; от около 0,1% до около 2%; от около 0,1% до около 1% или от около 0,1% до около 0,5% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 40%; от около 0,5% до около 40%; от около 1% до около 40%; от около 2% до около 40%; от около 3% до около 40%; от около 4% до около 40%; от около 5% до около 40%; от около 6% до около 40%; от около 7% до около 40%; от около 8% до около 40%; от около 9% до около 40%; от около 10% до около 40%; от около 11% до около 40%; от около 12% до около 40%; от около 13% до около 40%; от около 14% до около 40%; от около 15% до около 40%; от около 16% до около 40%; от около 17% до около 40%; от около 18% до около 40%; от около 19% до около 40%; от около 20% до около 40%; от около 21% до около 40%; от около 22% до около 40%; от около 23% до около 40%; от около 24% до около 40%; от около 25% до около 40%; от около 26% до около 40%; от около 27% до около 40%; от около 28% до около 40%; от около 29% до около 40%; от около 30% до около 40%; от около 31% до около 40%; от около 32% до около 40%; от около 33% до около 40%; от около 34% до около 40%; от около 35% до около 40%; от около 36% до около 40%; от около 37% до около 40%; от около 38% до около 40% или от около 39% до около 40% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 40%; от около 0,1% до около 39%; от около 0,1% до около 38%; от около 0,1% до около 37%; от около 0,1% до около 36%; от около 0,1% до около 35%; от около 0,1% до около 34%; от около 0,1% до около 33%; от около 0,1% до около 32%; от около 0,1% до

около 31%; от около 0,1% до около 30%; от около 0,1% до около 29%; от около 0,1% до около 28%; от около 0,1% до около 27%; от около 0,1% до около 26%; от около 0,1% до около 25%; от около 0,1% до около 24%; от около 0,1% до около 23%; от около 0,1% до около 22%; от около 0,1% до около 21%; от около 0,1% до около 20%; от около 0,1% до около 19%; от около 0,1% до около 18%; от около 0,1% до около 17%; от около 0,1% до около 16%; от около 0,1% до около 15%; от около 0,1% до около 14%; от около 0,1% до около 13%; от около 0,1% до около 12%; от около 0,1% до около 11%; от около 0,1% до около 10%; от около 0,1% до около 9%; от около 0,1% до около 8%; от около 0,1% до около 7%; от около 0,1% до около 6%; от около 0,1% до около 5%; от около 0,1% до около 4%; от около 0,1% до около 3%; от около 0,1% до около 2%; от около 0,1% до около 1% или от около 0,1% до около 0,5% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 20%; от около 0,5% до около 20%; от около 1% до около 20%; от около 2% до около 20%; от около 3% до около 20%; от около 4% до около 20%; от около 5% до около 20%; от около 6% до около 20%; от около 7% до около 20%; от около 8% до около 20%; от около 9% до около 20%; от около 10% до около 20%; от около 11% до около 20%; от около 12% до около 20%; от около 13% до около 20%; от около 14% до около 20%; от около 15% до около 20%; от около 16% до около 20%; от около 17% до около 20%; от около 18% до около 20% или от около 19% до около 20% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 20%; от около 0,1% до около 19%; от около 0,1% до около 18%; от около 0,1% до около 17%; от около 0,1% до около 16%; от около 0,1% до около 15%; от около 0,1% до около 14%; от около 0,1% до около 13%; от около 0,1% до около 12%; от около 0,1% до около 11%; от около 0,1% до около 10%; от около 0,1% до около 9%; от около 0,1% до около 8%; от около 0,1% до около 7%; от около 0,1% до около 6%; от около 0,1% до около 5%; от около 0,1% до около 4%; от около 0,1% до около 3%; от около 0,1% до около 2%; от около 0,1% до около 1% или от около 0,1% до около 0,5% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из мальтодекстрина в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 99,9%; от около 1% до около 99,9%; от около 2% до около 99,9%; от около 3% до около 99,9%; от около 4% до около 99,9%; от около 5% до около 99,9%; от около 6% до около 99,9%; от около 7% до около 99,9%; от около 8% до около 99,9%; от около 9% до около 99,9%; от около 10% до около 99,9%; от около 11% до около 99,9%; от около 12% до около 99,9%; от около 13% до около 99,9%; от около 14% до около 99,9%; от около 15% до около 99,9%; от около 16% до около 99,9%; от около 17% до около 99,9%; от около 18% до около 99,9%; от около 19% до около 99,9%; от около 20% до около 99,9%; от около 21% до около 99,9%; от около 22% до около 99,9%; от около 23% до около 99,9%; от около 24% до около 99,9%; от около 25% до около 99,9%; от около 26% до около 99,9%; от около

27% до около 99,9%; от около 28% до около 99,9%; от около 29% до около 99,9%; от около 30% до около 99,9%; от около 31% до около 99,9%; от около 32% до около 99,9%; от около 33% до около 99,9%; от около 34% до около 99,9%; от около 35% до около 99,9%; от около 36% до около 99,9%; от около 37% до около 99,9%; от около 38% до около 99,9%; от около 39% до около 99,9%; от около 40% до около 99,9%; от около 41% до около 99,9%; от около 42% до около 99,9%; от около 43% до около 99,9%; от около 44% до около 99,9%; от около 45% до около 99,9%; от около 46% до около 99,9%; от около 47% до около 99,9%; от около 48% до около 99,9%; от около 49% до около 99,9%; от около 50% до около 99,9%; от около 51% до около 99,9%; от около 52% до около 99,9%; от около 53% до около 99,9%; от около 54% до около 99,9%; от около 55% до около 99,9%; от около 56% до около 99,9%; от около 57% до около 99,9%; от около 58% до около 99,9%; от около 59% до около 99,9%; от около 60% до около 99,9%; от около 61% до около 99,9%; от около 62% до около 99,9%; от около 63% до около 99,9%; от около 64% до около 99,9%; от около 65% до около 99,9%; от около 66% до около 99,9%; от около 67% до около 99,9%; от около 68% до около 99,9%; от около 69% до около 99,9%; от около 70% до около 99,9%; от около 71% до около 99,9%; от около 72% до около 99,9%; от около 73% до около 99,9%; от около 74% до около 99,9%; от около 75% до около 99,9%; от около 76% до около 99,9%; от около 77% до около 99,9%; от около 78% до около 99,9%; от около 79% до около 99,9%; от около 80% до около 99,9%; от около 81% до около 99,9%; от около 82% до около 99,9%; от около 83% до около 99,9%; от около 84% до около 99,9%; от около 85% до около 99,9%; от около 86% до около 99,9%; от около 87% до около 99,9%; от около 88% до около 99,9%; от около 89% до около 99,9%; от около 90% до около 99,9%; от около 91% до около 99,9%; от около 92% до около 99,9%; от около 93% до около 99,9%; от около 94% до около 99,9%; от около 95% до около 99,9%; от около 96% до около 99,9%; от около 97% до около 99,9%; от около 98% до около 99,9% или от около 99% до около 99,9% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из мальтодекстрина в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 99%; от около 0,1% до около 98%; от около 0,1% до около 97%; от около 0,1% до около 96%; от около 0,1% до около 95%; от около 0,1% до около 94%; от около 0,1% до около 93%; от около 0,1% до около 92%; от около 0,1% до около 91%; от около 0,1% до около 90%; от около 0,1% до около 89%; от около 0,1% до около 88%; от около 0,1% до около 87%; от около 0,1% до около 86%; от около 0,1% до около 85%; от около 0,1% до около 84%; от около 0,1% до около 83%; от около 0,1% до около 82%; от около 0,1% до около 81%; от около 0,1% до около 80%; от около 0,1% до около 79%; от около 0,1% до около 78%; от около 0,1% до около 77%; от около 0,1% до около 76%; от около 0,1% до около 75%; от около 0,1% до около 74%; от около 0,1% до около 73%; от около 0,1% до около 72%; от около 0,1% до около 71%; от около 0,1% до около 70%; от около 0,1% до около 69%; от около 0,1% до около 68%; от около 0,1% до около 67%; от около 0,1% до около 66%; от около 0,1% до около 65%; от около 0,1% до около 64%; от около 0,1% до около 63%; от около

0,1% до около 62%; от около 0,1% до около 61%; от около 0,1% до около 60%; от около 0,1% до около 59%; от около 0,1% до около 58%; от около 0,1% до около 57%; от около 0,1% до около 56%; от около 0,1% до около 55%; от около 0,1% до около 54%; от около 0,1% до около 53%; от около 0,1% до около 52%; от около 0,1% до около 51%; от около 0,1% до около 50%; от около 0,1% до около 49%; от около 0,1% до около 48%; от около 0,1% до около 47%; от около 0,1% до около 46%; от около 0,1% до около 45%; от около 0,1% до около 44%; от около 0,1% до около 43%; от около 0,1% до около 42%; от около 0,1% до около 41%; от около 0,1% до около 40%; от около 0,1% до около 39%; от около 0,1% до около 38%; от около 0,1% до около 37%; от около 0,1% до около 36%; от около 0,1% до около 35%; от около 0,1% до около 34%; от около 0,1% до около 33%; от около 0,1% до около 32%; от около 0,1% до около 31%; от около 0,1% до около 30%; от около 0,1% до около 29%; от около 0,1% до около 28%; от около 0,1% до около 27%; от около 0,1% до около 26%; от около 0,1% до около 25%; от около 0,1% до около 24%; от около 0,1% до около 23%; от около 0,1% до около 22%; от около 0,1% до около 21%; от около 0,1% до около 20%; от около 0,1% до около 19%; от около 0,1% до около 18%; от около 0,1% до около 17%; от около 0,1% до около 16%; от около 0,1% до около 15%; от около 0,1% до около 14%; от около 0,1% до около 13%; от около 0,1% до около 12%; от около 0,1% до около 11%; от около 0,1% до около 10%; от около 0,1% до около 9%; от около 0,1% до около 8%; от около 0,1% до около 7%; от около 0,1% до около 6%; от около 0,1% до около 5%; от около 0,1% до около 4%; от около 0,1% до около 3%; от около 0,1% до около 2%; от около 0,1% до около 1% или от около 0,1% до около 0,5% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления мальтодекстрин может иметь эквивалент декстрозы в диапазоне от около 2% до около 20%; от около 3% до около 20%; от около 4% до около 20%; от около 5% до около 20%; от около 6% до около 20%; от около 7% до около 20%; от около 8% до около 20%; от около 9% до около 20%; от около 10% до около 20%; от около 11% до около 20%; от около 12% до около 20%; от около 13% до около 20%; от около 14% до около 20%; от около 15% до около 20%; от около 16% до около 20%; от около 17% до около 20%; от около 18% до около 20%; или от около 19% до около 20% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления мальтодекстрин может иметь эквивалент декстрозы в диапазоне от около 2% до около 20%; от около 2% до около 19%; от около 2% до около 18%; от около 2% до около 17%; от около 2% до около 16%; от около 2% до около 15%; от около 2% до около 14%; от около 2% до около 13%; от около 2% до около 12%; от около 2% до около 11%; от около 2% до около 10%; от около 2% до около 9%; от около 2% до около 8%; от около 2% до около 7%; от около 2% до около 6%; от около 2% до около 5%; от около 2% до около 4%; или от около 2% до около 3% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из бензизотиазолинона (БИТ) в концентрации в диапазоне от около 0,01% до около 1%; от

около 0,025% до около 1%; от около 0,05% до около 1%; от около 0,075% до около 1%; от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из бензизотиазолинона (БИТ) в концентрации в диапазоне от около 0,01% до около 1%; от около 0,01% до около 0,975%; от около 0,01% до около 0,95%; от около 0,01% до около 0,925%; от около 0,01% до около 0,9%; от около 0,01% до около 0,875%; от около 0,01% до около 0,85%; от около 0,01% до около 0,825%; от около 0,01% до около 0,8%; от около 0,01% до около 0,775%; от около 0,01% до около 0,75%; от около 0,01% до около 0,725%; от около 0,01% до около 0,7%; от около 0,01% до около 0,675%; от около 0,01% до около 0,65%; от около 0,01% до около 0,625%; от около 0,01% до около 0,6%; от около 0,01% до около 0,575%; от около 0,01% до около 0,55%; от около 0,01% до около 0,525%; от около 0,01% до около 0,5%; от около 0,01% до около 0,475%; от около 0,01% до около 0,45%; от около 0,01% до около 0,425%; от около 0,01% до около 0,4%; от около 0,01% до около 0,375%; от около 0,01% до около 0,35%; от около 0,01% до около 0,325%; от около 0,01% до около 0,3%; от около 0,01% до около 0,275%; от около 0,01% до около 0,25%; от около 0,01% до около 0,225%; от около 0,01% до около 0,2%; от около 0,01% до около 0,175%; от около 0,01% до около 0,15%; от около 0,01% до около 0,125%; от около 0,01% до около 0,1%; от около 0,01% до около 0,075%; от около 0,01% до около 0,05% или от около 0,01% до около 0,025% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления БИТ может представлять собой 1,2-бензизотиазолин-3-он. В данном документе представлен типичный 1,2-бензизотиазолин-3-он, имеющий CAS № 2634-33-5. Примерное описание, описывающее, как получить 1,2-бензизотиазолин-3-он, представлено в публикации ВОИС № WO 2014173716 A1, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, 1,2-бензизотиазолин-3-он легко доступен у коммерческих поставщиков, например, PROXEL® AQ Preservative; 9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она можно приобрести в Lonza Group Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Базель, Швейцария.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из лигносульфоната в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из лигносульфоната в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,1% до около 0,975%; от около 0,1% до около 0,95%; от около 0,1% до около 0,925%; от около 0,1% до около 0,9%; от около 0,1% до около 0,875%; от около 0,1% до около 0,85%; от около 0,1% до около 0,825%; от около 0,1% до около 0,8%; от около 0,1% до около 0,775%; от около 0,1% до около 0,75%; от около 0,1% до около 0,725%; от около 0,1% до около 0,7%; от около 0,1% до около 0,675%; от около 0,1% до около 0,65%; от около 0,1% до около 0,625%; от около 0,1% до около 0,6%; от около 0,1% до около 0,575%; от около 0,1% до около 0,55%; от около 0,1% до около 0,525%; от около 0,1% до около 0,5%; от около 0,1% до около 0,475%; от около 0,1% до около 0,45%; от около 0,1% до около 0,425%; от около 0,1% до около 0,4%; от около 0,1% до около 0,375%; от около 0,1% до около 0,35%; от около 0,1% до около 0,325%; от около 0,1% до около 0,3%; от около 0,1% до около 0,275%; от около 0,1% до около 0,25%; от около 0,1% до около 0,225%; от около 0,1% до около 0,2%; от около 0,1% до около 0,175%; от около 0,1% до около 0,15% или от около 0,1% до около 0,125% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из гипса в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до

около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из гипса в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,1% до около 0,975%; от около 0,1% до около 0,95%; от около 0,1% до около 0,925%; от около 0,1% до около 0,9%; от около 0,1% до около 0,875%; от около 0,1% до около 0,85%; от около 0,1% до около 0,825%; от около 0,1% до около 0,8%; от около 0,1% до около 0,775%; от около 0,1% до около 0,75%; от около 0,1% до около 0,725%; от около 0,1% до около 0,7%; от около 0,1% до около 0,675%; от около 0,1% до около 0,65%; от около 0,1% до около 0,625%; от около 0,1% до около 0,6%; от около 0,1% до около 0,575%; от около 0,1% до около 0,55%; от около 0,1% до около 0,525%; от около 0,1% до около 0,5%; от около 0,1% до около 0,475%; от около 0,1% до около 0,45%; от около 0,1% до около 0,425%; от около 0,1% до около 0,4%; от около 0,1% до около 0,375%; от около 0,1% до около 0,35%; от около 0,1% до около 0,325%; от около 0,1% до около 0,3%; от около 0,1% до около 0,275%; от около 0,1% до около 0,25%; от около 0,1% до около 0,225%; от около 0,1% до около 0,2%; от около 0,1% до около 0,175%; от около 0,1% до около 0,15% или от около 0,1% до около 0,125% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из сорбита в концентрации в диапазоне от около 0,5% до около 8%; от около 0,75% до около 8%; от около 1% до около 8%; от около 1,25% до около 8%; от около 1,5% до около 8%; от около 1,75% до около 8%; от около 2% до около 8%; от около 2,25% до около 8%; от около 2,5% до около 8%; от около 2,75% до около 8%; от около 3% до около 8%; от около 3,25% до около 8%; от около 3,5% до около 8%; от около 3,75% до около 8%; от около 4% до около 8%; от около 4,25% до около 8%; от около 4,5% до около 8%; от около 4,75% до около 8%; от около 5% до около 8%; от около 5,25% до около 8%; от около 5,5% до около 8%; от около 5,75% до около 8%; от около 6% до около 8%; от около 6,25% до около 8%; от около 6,5% до около 8%; от около 6,75% до около 8%; от около 7% до около 8%; от около 7,25% до около 8%; от около 7,5% до около 8% или от около 7,75% до около 8% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из сорбита в концентрации в диапазоне от около 0,5% до около 8%; от около 0,5% до около 7,75%; от около 0,5% до около 7,5%; от около 0,5% до около 7,25%; от около 0,5% до около 7%; от около 0,5% до около 6,75%; от около 0,5% до около 6,5%; от около 0,5% до около 6,25%; от около 0,5% до около 6%; от около 0,5% до около 5,75%; от около 0,5% до около 5,5%; от около 0,5% до около 5,25%; от около 0,5% до около 5%; от около 0,5% до около 4,75%; от около 0,5% до около 4,5%; от около 0,5% до около 4,25%; от около 0,5% до около 4%; от около 0,5% до около 3,75%; от около 0,5% до около 3,5%; от около 0,5% до около 3,25%; от около 0,5% до около 3%; от около 0,5% до около 2,75%; от около 0,5% до около 2,5%; от около 0,5% до около 2,25%; от около 0,5% до около 2%; от около

0,5% до около 1,75%; от около 0,5% до около 1,5%; от около 0,5% до около 1,25%; от около 0,5% до около 1% или от около 0,5% до около 0,75% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из бензоата натрия в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из бензоата натрия в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,1% до около 0,975%; от около 0,1% до около 0,95%; от около 0,1% до около 0,925%; от около 0,1% до около 0,9%; от около 0,1% до около 0,875%; от около 0,1% до около 0,85%; от около 0,1% до около 0,825%; от около 0,1% до около 0,8%; от около 0,1% до около 0,775%; от около 0,1% до около 0,75%; от около 0,1% до около 0,725%; от около 0,1% до около 0,7%; от около 0,1% до около 0,675%; от около 0,1% до около 0,65%; от около 0,1% до около 0,625%; от около 0,1% до около 0,6%; от около 0,1% до около 0,575%; от около 0,1% до около 0,55%; от около 0,1% до около 0,525%; от около 0,1% до около 0,5%; от около 0,1% до около 0,475%; от около 0,1% до около 0,45%; от около 0,1% до около 0,425%; от около 0,1% до около 0,4%; от около 0,1% до около 0,375%; от около 0,1% до около 0,35%; от около 0,1% до около 0,325%; от около 0,1% до около 0,3%; от около 0,1% до около 0,275%; от около 0,1% до около 0,25%; от около 0,1% до около 0,225%; от около 0,1% до около 0,2%; от около 0,1% до около 0,175%; от около 0,1% до около 0,15% или от около 0,1% до около 0,125% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из сорбата калия в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до

около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из сорбата калия в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,1% до около 0,975%; от около 0,1% до около 0,95%; от около 0,1% до около 0,925%; от около 0,1% до около 0,9%; от около 0,1% до около 0,875%; от около 0,1% до около 0,85%; от около 0,1% до около 0,825%; от около 0,1% до около 0,8%; от около 0,1% до около 0,775%; от около 0,1% до около 0,75%; от около 0,1% до около 0,725%; от около 0,1% до около 0,7%; от около 0,1% до около 0,675%; от около 0,1% до около 0,65%; от около 0,1% до около 0,625%; от около 0,1% до около 0,6%; от около 0,1% до около 0,575%; от около 0,1% до около 0,55%; от около 0,1% до около 0,525%; от около 0,1% до около 0,5%; от около 0,1% до около 0,475%; от около 0,1% до около 0,45%; от около 0,1% до около 0,425%; от около 0,1% до около 0,4%; от около 0,1% до около 0,375%; от около 0,1% до около 0,35%; от около 0,1% до около 0,325%; от около 0,1% до около 0,3%; от около 0,1% до около 0,275%; от около 0,1% до около 0,25%; от около 0,1% до около 0,225%; от около 0,1% до около 0,2%; от около 0,1% до около 0,175%; от около 0,1% до около 0,15% или от около 0,1% до около 0,125% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из ЭДТА в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,125% до около 1%; от около 0,15% до около 1%; от около 0,175% до около 1%; от около 0,2% до около 1%; от около 0,225% до около 1%; от около 0,25% до около 1%; от около 0,275% до около 1%; от около 0,3% до около 1%; от около 0,325% до около 1%; от около 0,35% до около 1%; от около 0,375% до около 1%; от около 0,4% до около 1%; от около 0,425% до около 1%; от около 0,45% до около 1%; от около 0,475% до около 1%; от около 0,5% до около 1%; от около 0,525% до около 1%; от около 0,55% до около 1%; от около 0,575% до около 1%; от около 0,6% до около 1%; от около 0,625% до около 1%; от около 0,65% до около 1%; от около 0,675% до около 1%; от около 0,7% до около 1%; от около 0,725% до около 1%; от около 0,75% до около 1%; от около 0,775% до около 1%; от около 0,8% до около 1%; от около 0,825% до около 1%; от около 0,85% до около 1%; от около 0,875% до около 1%; от около 0,9% до около 1%; от около 0,925% до около 1%; от около 0,95% до около 1% или от около 0,975% до около 1% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению состоит из ЭДТА в концентрации в диапазоне от около 0,1% до около 1%; от около 0,1% до около 0,975%; от около 0,1% до около 0,95%; от около 0,1% до около 0,925%; от около 0,1% до около 0,9%; от около 0,1% до около 0,875%; от около 0,1% до около 0,85%; от около 0,1% до около 0,825%; от около 0,1% до около 0,8%; от около 0,1% до около 0,775%; от около 0,1% до около 0,75%; от около 0,1% до около 0,725%; от около 0,1% до около 0,7%; от

около 0,1% до около 0,675%; от около 0,1% до около 0,65%; от около 0,1% до около 0,625%; от около 0,1% до около 0,6%; от около 0,1% до около 0,575%; от около 0,1% до около 0,55%; от около 0,1% до около 0,525%; от около 0,1% до около 0,5%; от около 0,1% до около 0,475%; от около 0,1% до около 0,45%; от около 0,1% до около 0,425%; от около 0,1% до около 0,4%; от около 0,1% до около 0,375%; от около 0,1% до около 0,35%; от около 0,1% до около 0,325%; от около 0,1% до около 0,3%; от около 0,1% до около 0,275%; от около 0,1% до около 0,25%; от около 0,1% до около 0,225%; от около 0,1% до около 0,2%; от около 0,1% до около 0,175%; от около 0,1% до около 0,15% или от около 0,1% до около 0,125% масс./масс. от всего состава.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению может быть приготовлен при pH в диапазоне от около 5 до около 11; от около 5,5 до около 11; от около 6 до около 11; от около 6,5 до около 11; от около 7 до около 11; от около 7,5 до около 11; от около 8 до около 11; от около 8,5 до около 11; от около 9 до около 11; от около 9,5 до около 11; от около 10 до около 11 или от около 10,5 до около 11.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению может быть приготовлен при pH в диапазоне от около 5 до около 11; от около 5 до около 10,5; от около 5 до около 10; от около 5 до около 9,5; от около 5 до около 9; от около 5 до около 8,5; от около 5 до около 8; от около 5 до около 7,5; от около 5 до около 7; от около 5 до около 6,5; от около 5 до около 6 или от около 5 до около 5,5.

В некоторых вариантах осуществления состав может быть приготовлен в форме гранул (гранулированный состав). Способы получения гранулированного состава хорошо известны в данной области техники и включают: кристаллизацию, осаждение, дражирование, покрытие в псевдоожиженном слое, агломерацию (например, агломерацию в псевдоожиженном слое), ротационное распыление, экструзию, дробление, сферонизацию, способы уменьшения размера, барабанная грануляция и/или грануляция с высоким усилием сдвига и т.п.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть получен путем агломерации, например, агломерации с распылительной сушкой; агломерации с повторным увлажнением; агломерация в псевдоожиженном слое; и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления тип агломерации может представлять собой агломерацию в псевдоожиженном слое. Примеры способов агломерации в псевдоожиженном слое представлены в патенте США № 7582147; содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть получен посредством агломерации в псевдоожиженном слое.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть получен путем распыления активных и инертных ингредиентов на чистый носитель в псевдоожиженном слое.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть

получен путем распыления активных и инертных ингредиентов (эксципиентов) на чистый носитель и гранулирования в лотковом грануляторе.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть получен путем смешивания активных и инертных порошков (т. е. одного или нескольких эксципиентов, описанных в настоящем документе) и воды, а затем гранулирован путем пропускания ингредиентов через экструдер.

В некоторых вариантах осуществления гранулированный состав может быть получен путем смешивания активных и инертных порошков (т. е. одного или нескольких эксципиентов, описанных в настоящем документе) с водой и гранулирован методом валкового прессования.

Любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей можно применять в любом из составов, описанных в настоящем документе и ниже, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять в составе: смачиваемого порошка или состава в виде гранул; или жидкого концентрированного состава.

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения

В настоящем изобретении рассматривают композиции, продукты и трансгенные организмы, которые содержат или, в случае трансгенных организмов, экспрессируют или иным образом продуцируют один или несколько TVP или один или несколько TVP-инсектицидных белков.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративная композиция состоит из: (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) эксципиента (например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления иллюстративная композиция состоит из: (1) TVP или его фармацевтически приемлемой соли; TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли или их комбинации; и (2) эксципиента (например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления иллюстративная композиция состоит из: (1) одного или нескольких TVP, одного или нескольких TVP-инсектицидных белков или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов (например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления иллюстративная композиция состоит из: (1) одного или нескольких TVP или их фармацевтически приемлемой соли; одного или нескольких TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемой соли, или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов (например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению состоят из: (1) одного или нескольких TVP, или одного или нескольких TVP-инсектицидных белков или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов

(например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению состоят из: (1) одного или нескольких TVP, или одного или нескольких TVP-инсектицидных белков или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов (например, любого из эксципиентов, описанных в настоящем документе); при этом любой из вышеуказанных (1) или (2) может использоваться одновременно или последовательно.

Любые композиции, продукты, полипептиды и/или растения, использующие TVP или TVP-инсектицидный белок (как описано в настоящем документе), можно использоваться для борьбы с вредителями, их ростом и/или ущербом, причиняемым их действиями, особенно их ущербом растениям.

Композиции, состоящие из TVP или TVP-инсектицидного белка и эксципиента, могут включать агрохимические композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления агрохимические композиции могут включать, помимо прочего, аэрозоли и/или аэрозольные продукты (например, спреи, фумиганты, порошки, пыль и/или газы); протравки семян; пероральные препараты (например, корм для насекомых и т. д.); или трансгенные организмы (например, клетка, растение или животное), экспрессирующие и/или продуцирующие TVP или TVP-инсектицидный белок, временно и/или стабильно.

В некоторых вариантах осуществления активные ингредиенты по настоящему изобретению можно применять в форме композиций и их можно применять к обрабатываемой площади или растению одновременно или последовательно с другими неактивными соединениями. Эти соединения могут представлять собой удобрения, средства для уничтожения сорняков, криопротекторы, поверхностно-активные вещества, детергенты, мыла, неактивные масла, полимеры и/или составы с пролонгированным высвобождением или с биоразлагаемыми носителями, которые позволяют длительное дозирование целевой области после однократного применения состава. Одно или несколько из этих неактивных соединений могут быть приготовлены, по желанию, вместе с другими сельскохозяйственно приемлемыми носителями, поверхностно-активными веществами или способствующими применению адъювантами, обычно используемыми в области составления составов. Подходящие носители и адъюванты могут быть твердыми или жидкими и соответствовать веществам, обычно используемым в технологии приготовления составов, например природные или регенерированные минеральные вещества, растворители, диспергаторы, смачивающие агенты, липкие вещества, связующие вещества или удобрения. Подобным образом составы могут быть приготовлены в виде съедобных «приманок» или превращены в «ловушки» для вредителей, чтобы обеспечить кормление или проглатывание пестицидного состава целевым вредителем.

Способы применения активного ингредиента по настоящему изобретению или агрохимической композиции по настоящему изобретению, состоящей из TVP или TVP-инсектицидного белка и эксципиента, полученных способами, описанными в настоящем описании, включают применение к листьям, покрытие семян и применение к грунту. В

некоторых вариантах количество применений и норма применения зависят от интенсивности заражения соответствующим вредителем.

Композиция, состоящая из TVP или TVP-инсектицидного белка и эксципиента, может быть приготовлена в виде порошка, пыли, пеллет, гранул, аэрозоля, эмульсии, коллоида, раствора и т.п. и может быть приготовлена такими обычными способами, как высушивание, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, осаждение или концентрация клеточной культуры, содержащей полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат по меньшей мере один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации от около 1% до около 99% по массе.

В некоторых вариантах осуществления композиции, состоящие из TVP или TVP-инсектицидных белков, можно профилактически применять к окружающей среде для предотвращения заражения восприимчивым вредителем, например, чешуекрылым и/или жесткокрылым вредителем, которые могут быть уничтожены или уменьшены в численности в данной области способами по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вредитель проглатывает пестицидно-эффективное количество полипептида или контактирует с ним.

В некоторых вариантах осуществления пестицидные композиции, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем приготовления суспензии бактерий, дрожжей или других клеток, кристаллов и/или спор, трансформированных либо TVP, либо TVP-инсектицидным белком, или выделенного белкового компонента с желаемым сельскохозяйственно приемлемым носителем. Композиции могут быть приготовлены перед введением в соответствующих средствах, таких как лиофилизированные, сублимированные, высушенные формы, или в водном носителе, среде или подходящем разбавителе, таком как физиологический раствор и/или другой буфер. В некоторых вариантах осуществления приготовленные композиции могут быть в форме пыли или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или воде, или масляно-водных эмульсиях, или в виде смачивающегося порошка, или в комбинации с любым другим материалом-носителем, подходящим для сельскохозяйственного применения. Подходящие сельскохозяйственные носители могут быть твердыми или жидкими и хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления составы могут быть смешаны с одним или несколькими твердыми или жидкими адъювантами и приготовлены различными способами, например, путем гомогенного перемешивания, смешивания и/или перетирания пестицидной композиции с подходящими адъювантами с использованием обычных способов приготовления. Подходящие составы и способы применения описаны в патенте США № 6468523, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%

идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7%

идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрина; трегалозы; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7представляет собой глицин;

и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрина; трегалозы; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81%

идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрин; трегалоза; мальтоза; двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4); одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4); лигносульфонат; гипс; сорбит; бензоат натрия; сорбат калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинон (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав, состоящий из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, может иметь TVP, составляющий 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% , 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% , 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% по массе от состава.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP и одного или нескольких эксципиентов, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5%

идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по

меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, имеющего линкер, при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, имеющего расщепляемый линкер, при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, имеющего линкер, при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP и одного или нескольких эксципиентов, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по

меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации, при этом, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из одного или нескольких эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из одного или нескольких эксципиентов, при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в

диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит по сути из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5

представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению

состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и

твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции; при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

Любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей можно применять в любом из составов, описанных в настоящем документе и ниже, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять в составе: смачиваемого порошка или состава в виде гранул; или жидкого концентрированного состава.

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрина; трегалозы; мальтозы; двухосновного фосфата калия ((K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4)); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81%

идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; при этом если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрина; трегалозы; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого

типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; при этом X_1 представляет собой Q; а Z_1 представляет собой A; и одного или нескольких следующих эксципиентов: мальтодекстрина; трегалозы; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинона (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 2, 49 или 51; и одного или нескольких из следующих эксципиентов: мальтодекстрин; трегалоза; мальтоза; двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4); одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4); лигносульфонат; гипс; сорбит; бензоат натрия; сорбат калия; ЭДТА и/или бензизотиазолинон (БИТ).

В некоторых вариантах осуществления состав, состоящий из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли и эксципиента, может иметь TVP, составляющий 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% , 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% , 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% по массе от состава.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP и одного или нескольких эксципиентов, при этом TVP содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; при этом X_1 представляет собой Q; а Z_1 представляет собой A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей

мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, указанных в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP и одного или нескольких эксципиентов, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации, при этом, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из одного или нескольких эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из одного или нескольких эксципиентов, при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит по сути из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в

количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; где TVP или TVP-инсектицидный белок; при этом Z_1 представляет собой T, а TVP является гликозилированным, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной

последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации; при этом, Z_1 представляет собой T, а TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по

меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации, при этом, X_1 представляет собой Q; а Z_1 представляет собой A.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по

меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом TVP находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза

находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс.; и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом TVP находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6%; и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%

идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом TVP находится в диапазоне около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне около 25% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне около 0,4% масс./масс.; и твердые вещества ферментации находятся в диапазоне около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере

на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом композиция по сути состоит из следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP, TVP-инсектицидного белка или его фармацевтически приемлемой соли, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом композиция по сути состоит из следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3%

масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции; при этом Z_1 представляет собой T, а TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-

D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции; при этом X_1 представляет собой Q; а Z_1 представляет собой A.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

Любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей можно применять в любом из составов, описанных в настоящем документе и ниже, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять в составе: смачиваемого порошка или состава в виде гранул; или жидкого концентрированного состава.

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способы защиты растений, частей растений и семян

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ борьбы с беспозвоночным вредителем в агрономических и/или неагрономических применениях, включающий приведение в контакт беспозвоночного вредителя или окружающей его среды, твердой поверхности, включая поверхность растения или его часть, с биологически эффективным количеством одного или нескольких TVP по изобретению или с инсектицидным белком, содержащим по меньшей мере один TVP.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен

способ борьбы с беспозвоночным вредителем в агрономических и/или неагрономических применениях, включающий приведение в контакт беспозвоночного вредителя или окружающей его среды, твердой поверхности, включая поверхность растения или его часть, с биологически эффективным количеством композиции, состоящей, по меньшей мере, из одного TVP по изобретению и эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ борьбы с беспозвоночным вредителем в агрономических и/или неагрономических применениях, включающий приведение в контакт беспозвоночного вредителя или окружающей его среды, твердой поверхности, включая поверхность растения или его часть, с биологически эффективным количеством композиции, состоящей по меньшей мере из одного TVP-инсектицидного белка по изобретению и эксципиента.

Примеры подходящих композиций, состоящих из: (1) по меньшей мере одного TVP по изобретению; двух или более TVP по настоящему изобретению; TVP-инсектицидного белка и/или двух или более TVP-инсектицидных белков; и (2) эксципиента; включают указанные композиции, приготовленные из неактивных ингредиентов, которые должны быть доставлены в форме: жидкого раствора, эмульсии, порошка, гранулы, наночастицы, микрочастицы или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления для достижения контакта с соединением, смесью или композицией по изобретению для защиты полевой культуры от беспозвоночных вредителей соединение или композицию обычно применят к семенам культуры перед посадкой, к листве (например, листьям, стеблям, цветам, плодам) культурных растений или к почве, или другой среде для выращивания до или после посадки культуры.

Одним из вариантов осуществления способа приведения в контакт является распыление. Альтернативно, к листве растений или почве можно применять гранулированную композицию, состоящую из TVP или TVP-инсектицидного белка и экципиента. Соединения по настоящему изобретению также могут быть эффективно доставлены через поглощение растениями при контакте растения с композицией, содержащей соединение по настоящему изобретению, применяемой в виде пропитки почвы жидким составом, гранулированного состава в почву, обработки ящиков для рассады или погружения саженцев. Следует отметить композицию по настоящему изобретению в форме жидкого состава для пропитки почвы. Также следует отметить способ борьбы с беспозвоночным вредителем, включающий приведение в контакт беспозвоночного вредителя или окружающей его среды с биологически эффективным количеством TVP или TVP-инсектицидного белка. Следует также отметить, что в некоторых иллюстративных вариантах осуществления в иллюстративном способе рассматривают почвенную среду, при этом композицию применяют к почве в виде состава для пропитки почвы. Следует также отметить, что TVP или TVP-инсектицидный белок также эффективны при локальном применении к очагу заражения. Другие способы при ведения в контакта включают применение соединения или композиции по

изобретению путем прямого и остаточного распыления, распыления с воздуха, с помощью гелей, покрытия семян, микрокапсулирования, системного поглощения, приманок, ушных бирок, болюсов, туманообразователей, фумигантов, аэрозолей, пыли и многих других средств. Один вариант осуществления способа при ведения в контакт представляет собой гранулу, палочку или таблетку удобрения со стабильными размерами, содержащую соединение или композицию по изобретению. Соединениями по данному изобретению можно также пропитывать материалы для изготовления устройств для борьбы с беспозвоночными (например, сетки от насекомых, применение к одежде, применение в составах свечей и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления TVP или TVP-инсектицидный белок также можно использовать при обработке семян для защиты семян от беспозвоночных вредителей. В контексте настоящего описания и формулы изобретения обработка семян означает приведение семян в контакт с биологически эффективным количеством TVP или TVP-инсектицидного белка, который обычно готовят в виде композиции по изобретению. Такая обработка семян защищает семена от беспозвоночных почвенных вредителей и, как правило, также может защитить корни и другие части растений, находящиеся в контакте с почвой проростков, развивающихся из прорастающих семян. Обработка семян может также обеспечивать защиту листвы за счет транслокации TVP или TVP-инсектицидного белка внутри развивающегося растения. Обработка семян может применяться ко всем типам семян, включая те, из которых прорастут растения, генетически трансформированные для проявления специализированных признаков. Кроме того, TVP или TVP-инсектицидный белок можно трансформировать в растение или его часть, например в клетку растения или семена растения, которые уже трансформированы, например, в растения, которые проявляют устойчивость к гербицидам, такие как глифосат-ацетилтрансфераза, которая обеспечивает устойчивость к глифосату.

Один из способов обработки семян заключается в опрыскивании семян или нанесении на них порошка TVP или TVP-инсектицидного белка (т.е. в виде приготовленной композиции, состоящей из TVP или TVP-инсектицидного белка и эксципиента) перед посевом семян. Композиции, составленные для обработки семян, обычно состоят из TVP или TVP-инсектицидного белка и пленкообразователя или адгезивного агента. Поэтому, как правило, композиция для покрытия семян по настоящему изобретению состоит из биологически эффективного количества TVP или TVP-инсектицидного белка и пленкообразователя или адгезивного агента. Семена можно покрыть путем распыления текучего концентрата суспензии непосредственно в вихревом слое семян с последующей сушкой семян. В качестве альтернативы на семена можно распылять другие типы составов, такие как смачиваемые порошки, растворы, суспоэмульсии, эмульгируемые концентраты и эмульсии в воде. Этот процесс особенно полезен для нанесения пленочных покрытий на семена. Специалисту в данной области техники доступны различные машины и процессы для нанесения покрытия. Подходящие процессы включают процессы, перечисленные в P. Kosters et al., Seed Treatment: Progress

and Prospects, 1994 BCPC Monograph No. 57, и ссылки, перечисленные в ней, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Обработанные семена обычно содержат TVP или TVP-инсектицидный белок в количестве от около 0,01 г до 1 кг на 100 кг семян (т.е. от около 0,00001 до 1% по массе семян до обработки). Текучая суспензия, приготовленная для обработки семян, обычно содержит от около 0,5 до около 70% активного ингредиента, от около 0,5 до около 30% пленкообразующего адгезива, от около 0,5 до около 20% диспергатора, от 0 до около 5% загустителя, от 0 до около 5% пигмента и/или красителя, от 0 до около 2% пеногасителя, от 0 до около 1% консерванта и от 0 до около 75% летучего жидкого разбавителя.

Способы применения составов и композиций

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ применения композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента для борьбы с насекомыми, при этом TVP выбран из одной или любой комбинации TVP, описанных в настоящем документе, например, инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотная последовательность Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; при этом указанный способ включает приготовление композиции и последующее применение указанной композиции к очагу насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ применения композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента для борьбы с насекомыми, при этом TVP выбран из одной или любой комбинации TVP, описанных в настоящем документе, например, инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотная последовательность Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; при этом указанный способ включает приготовление композиции и последующее применение указанной композиции к очагу насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ применения композиции для борьбы с насекомыми, причем указанная композиция состоит из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента; при этом насекомые выбраны из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia unipuncta*); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной

гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует один или несколько TVP, или кодирующие их полинуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP имеет одну

аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид, при этом растение защищено от насекомых, выбранных из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g.

мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia unipuncta); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика;

корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ борьбы с насекомыми, включающий предоставление указанному насекомому трансгенного растения, которое содержит в своем геноме стабильно встроенную конструкцию нуклеиновой кислоты, при этом указанная стабильно встроенная конструкция нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, способный кодировать TVP.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента, при этом TVP выбран из одной или любой комбинации TVP, описанных в настоящем документе, например, инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотная последовательность Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; и при этом композицию применяют к очагу вредителя или к растению или животному, подверженному нападению вредителя.

Любая из композиций, описанных в настоящем документе, может быть использована в способе уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающем применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента.

Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP и

одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение

пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, при этом TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных

расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, имеющего линкер, при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, имеющего расщепляемый линкер, при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, имеющего линкер, при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любом одна из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G

или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации, при этом, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов, при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до

около 30% от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей по сути из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого

типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок имеет одну аминокислотную замену в X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-

инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции; при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

Любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей можно применять в любом из составов, описанных в настоящем документе и ниже, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять в составе: смачиваемого порошка или состава в виде гранул; или жидкого концентрированного состава.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка; и (2) эксципиента; к очагу вредителя, при этом вредитель выбран из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia unipuncta*); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя

(Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga

sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента, при этом TVP выбран из одной или любой комбинации TVP, описанных в настоящем документе, например, инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотная последовательность Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; и при этом композицию применяют к очагу вредителя или к растению или животному, подверженному нападению вредителя.

Любая из композиций, описанных в настоящем документе, может быть использована в способе уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающем применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из: (1) TVP или TVP-инсектицидного белка и (2) эксципиента.

Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по

меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом Z_1 представляет собой T, а TVP является гликозилированным, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом X_1представляет собой Q, а Z_1представляет собой A, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична

или на 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, при этом TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, имеющего линкер, при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению состоит из TVP, имеющего расщепляемый линкер, при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP, имеющего линкер, при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любом одна из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 55% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 65% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 81% идентична, по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 83% идентична, по меньшей мере на 84% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 86% идентична, по меньшей мере на 87%

идентична, по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична, по меньшей мере на 99,5% идентична, по меньшей мере на 99,6% идентична, по меньшей мере на 99,7% идентична, по меньшей мере на 99,8% идентична, по меньшей мере на 99,9% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации, при этом, если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов, при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около

0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей по сути из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из следующего: TVP или TVP-инсектицидного белка в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного

фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом Z_1 представляет собой T, а TVP гликозилирован, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом X_1представляет собой Q; и Z_1представляет собой A, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции, состоящей из (1) TVP, TVP-

инсектицидного белка или их комбинации; и (2) множества эксципиентов; при этом TVP или TVP-инсектицидный белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции; при этом если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая соответствует по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно-эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно-эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP содержит аминокислотную

последовательность, которая соответствует по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 51, или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51, или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно-эффективного количества инсектицидного варианта полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), причем указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 51, или его фармацевтически приемлемой соли к очагу вредителя.

Любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей можно применять в любой из композиций, описанных в настоящем документе, например, любой из вышеуказанных TVP, TVP-инсектицидных белков или их фармацевтически приемлемых солей, можно применять для уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя и/или для применения к очагу вредителя, при этом вредитель выбран из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia unipuncta*); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar);

гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

КУЛЬТУРЫ И ВРЕДИТЕЛИ

Конкретные вредители сельскохозяйственных культур и насекомые, с которыми можно бороться с помощью этих способов, включают следующее: Dictyoptera (тараканы); Isoptera (термиты); Orthoptera (саранча, кузнечики и сверчки); Diptera (комнатные мухи, комары, мухи цеце, комары-долгоножки и плодовые мухи); Hymenoptera (муравьи, осы,

пчелы, пилильщики, наездники и галловые осы); Anoplura (кусающие и сосущие вши); Siphonaptera (блохи) и Hemiptera (жуки и тля), а также паукообразных, таких как Acari (клещи), и паразитов, которые есть у каждого из этих организмов.

«Вредитель» включает, помимо прочего: насекомых, грибки, бактерии, нематоды, клещей, и т.п.

Насекомые-вредители включают, помимо прочего, насекомых, выбранных из отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthroptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera и т.п. В частности, насекомые-вредители включают Coleoptera (жесткокрылых), Lepidoptera (чешуекрылых) и Diptera (двукрылых).

Насекомые, имеющие подходящее сельскохозяйственное, бытовое и/или медицинское/ветеринарное значение для обработки инсектицидными полипептидами, включают, помимо прочего, представителей следующих классов и отрядов:

Отряд Coleoptera включает подотряды Adephaga и Polyphaga. Подотряд Adephaga включает надсемейства Caraboidea и Gyrinoidea. Подотряд Polyphaga включает надсемейства Hydrophiloidea, Staphylinoidea, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea и Curculionoidea. Надсемейство Caraboidea включает семейства Cicindelidae, Carabidae и Dytiscidae. Надсемейство Gyrinoidea включает семейство Gyrinidae. Надсемейство Hydrophiloidea включает семейство Hydrophilidae. Надсемейство Staphylinoidea включает семейства Silphidae и Staphylinidae. Надсемейство Cantharoidea включает семейства Cantharidae и Lampyridae. Надсемейство Cleroidea включает семейства Cleridae и Dermestidae. Надсемейство Elateroidea включает семейства Elateridae и Buprestidae. Надсемейство Cucujoidea включает семейство Coccinellidae. Надсемейство Meloidea включает семейство Meloidae. Надсемейство Tenebrionoidea включает семейство Tenebrionidae. Надсемейство Scarabaeoidea включает семейства Passalidae и Scarabaeidae. Надсемейство Cerambycoidea включает семейство Cerambycidae. Надсемейство Chrysomeloidea включает семейство Chrysomelidae. Надсемейство Curculionoidea включает семейства Curculionidae и Scolytidae.

Примеры Coleoptera включают, помимо прочего, следующее: американский бобовый долгоносик Acanthoscelides obtectus, жук-листоед Agelastica alni, жуки-щелкуны (Agriotes lineatus, Agriotes obscurus, Agriotes bicolor), зерновой жук Ahasverus advena, нехрущ июньский Amphimallon solstitialis, мебельный жук Anobium punctatum, Anthonomus spp. (долгоносики), карликовый жук-мангольд Atomaria linearis, ковровые жуки (Anthrenus spp., Attagenus spp.), четырехпятнистая зерновка Callosobruchus maculates, сухофруктовый жук Carpophilus hemipterus, капустный долгоносик Ceutorhynchus assimilis, рапсовый зимний стеблевой долгоносик Ceutorhynchus picitarsis, проволочники Conoderus vespertinus и Conoderus falli, банановый долгоносик Cosmopolites sordidus, новозеландская травяная личинка Costelytra zealandica, июньский жук Cotinis nitida, стеблевой долгоносик

подсолнечника Cylindrocopturus adspersus, кладовой жук Dermestes lardarius, западные кукурузные корневые жуки Diabrotica virgifera, Diabrotica virgifera virgifera, и Diabrotica barberi, мексиканский бобовый жук Epilachna varivestis, домовый усач Hylotropes bajulus, люцерновый долгоносик Hypera postica, гладкий жук-паук Gibbium psylloides, табачный жук Lasioderma serricorne, колорадский жук Leptinotarsa decemlineata, жуки Lyctus (Lyctus spp.), рапсовый цветоед Meligethes aeneus, майский жук западный Melolontha melolontha, американский жук-паук Mezium americanum, притворяшка шелковистый Niptus hololeucus, зерновые жуки Oryzaephilus surinamensis и Oryzaephilus mercator, черный виноградный долгоносик Otiorhynchus sulcatus, жук-листоед Phaedon cochleariae, крестоцветная блошка Phyllotreta cruciferae, полосатая блошка Phyllotreta striolata, капустная паровая блошка Psylliodes chrysocephala, Ptinus spp. (жуки-пауки), Малый зерновой *мотылек Rhizopertha* dominica, гороховый листовой долгоносик Sitona lineatus, рисовые и амбарные жуки Sitophilus oryzae и Sitophilus granaries, красный подсолнечный долгоносик Smicronyx fulvus, хлебный точильщик Stegobium paniceum, желтый мучной жук Tenebrio molitor, мучные жуки Tribolium castaneum и Tribolium confusum, складские и шкафные жуки (Trogoderma spp.) и подсолнуховый жук Zygogramma exclamationis.

Примеры Dermaptera (уховертки) включают, помимо прочего: европейскую уховертку Forficula auricularia, и полосатую уховертку Labidura riparia.

Примеры Dictvonteraвключают, помимо прочего: восточного таракана Blatta orientalis, немецкого таракана Blatella germanica, таракана Мадейры Leucophaea maderae, американского таракана Periplaneta americana, и дымчато-коричневого таракана Periplaneta fuliginosa.

Примеры Diplonodaвключают, помимо прочего: пятнистую змеиную многоножку Blaniulus guttulatus, плоскоспинную многоножку Brachydesmus superus, и оранжерейную многоножку Oxidus gracilis.

Отряд Diptera включает подотряды Nematocera, Brachycera и Cyclorrhapha. Подотряд Nematocera включает семейства Tipulidae, Psychodidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Simuliidae, Bibionidae и Cecidomyiidae. Подотряд Brachycera включает семейства Stratiomyidae, Tabanidae, Therevidae, Asilidae, Mydidae, Bombyliidae и Dolichopodidae. Подотряд Cyclorrhapha включает в себя отделы Aschiza и Aschiza. Отдел Aschiza включает семейства Phoridae, Syrphidae и Conopidae. Отдел Aschiza включает в себя отделы Acalyptratae и Calyptratae. Секция Acalyptratae включает семейства Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae и Drosophilidae. Секция Calyptratae включает семейства Hippoboscidae, Oestridae, Tachinidae, Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae и Sarcophagidae.

Примеры Dipteraвключают, помимо прочего, следующее: комнатная муха (Musca domestica), африканская муха тумбу (Cordylobia anthropophaga), мокрецы (Culicoides spp.), пчелиная вошь (Braula spp.), свекольная муха Pegomyia betae, черные *мухи (Cnephia spp.,* Eusimulium spp., Simulium spp.), оводы (Cuterebra spp., Gastrophilus spp., Oestrus spp.), долгоножки (Tipula spp.), глазные комары (Hippelates spp.), мухи, размножающиеся в грязи (Calliphora spp., Fannia spp., Hermetia spp., Lucilia spp., Musca spp., Muscina spp., Phaenicia spp.,

Phormia spp.), мясные мухи (Sarcophaga spp., Wohlfahrtia spp.); летающая муха Oscinella frit, плодовые мошки (Dacus spp., Drosophila spp.), зубоножки (Hydrotea spp.), гессенская муха Mayetiola destructor, мухи крупного рогатого скота (Haematobia spp.), мухи лошадей и оленей (Chrysops spp., Haematopota spp., Tabanus spp.), вши-мухи (Lipoptena spp., Lynchia spp., and Pseudolynchia spp.), средиземноморские мухи (Ceratitus spp.), комары (Aedes spp., Anopheles spp., Culex spp., Psorophora spp.), москиты (Phlebotomus spp., Lutzomyia.spp.), винтовые мухи (Chtysomya bezziana и Cochliomyia hominivorax), рунец овечий (Melophagus spp.); устойчивые мухи (Stomoxys spp.), мухи цеце (Glossina spp.) и подкожные оводы (Hypoderma spp.).

Примеры Isontera(термиты) включают, помимо прочего: виды из семейств Hodotennitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotennitidae, Serritermitidae, Termitidae, Termopsidae.

Примеры Heteropteraвключают, помимо прочего, чледующее: постельный клоп Cimex lectularius, «краситель хлопка» Dysdercus intermedius, вредная черепашка Eurygaster integriceps, потускневший растительный жук Lygus lineolaris, зеленый жук-вонючка Nezara antennata, южный зеленый клоп-вонючка Nezara viridula и триатомовые клопы Panstrogylus megistus, Rhodnius ecuadoriensis, Rhodnius pallescans, Rhodnius prolixus, Rhodnius robustus, Triatoma dimidiata, Triatoma infestans и Triatoma sordida.

Примеры Homopteraвключают, помимо прочего, следующее: красная померанцевая щитовка Aonidiella aurantii, черная бобовая тля Aphis fabae, хлопковая или бахчевая тля Aphis gossypii, зеленая яблоневая тля Aphis pomi, цитрусовая колючая белокрылка Aleurocanthus spiniferus, олеандровая щитовка Aspidiotus hederae, белокрылка сладкого картофеля Bemesia tabaci, капустная тля Brevicoryne brassicae, грушевая листоблошка Cacopsylla pyricola, смородиновая тля Cryptomyzus ribis, виноградная филлоксера Daktulosphaira vitifoliae, мексиканская листоблошка Diaphorina citri, картофельная цикадка Empoasca fabae, бобовая цикадка Empoasca solana, цикадка Empoasca vitis, мохнатая тля Eriosoma lanigerum, европейская фруктовая щитовка Eulecanium corni, мучнистая сливовая тля Hyalopterus arundinis, маленькая коричневая цикадка Laodelphax striatellus, картофельная тля Macrosiphum euphorbiae, зеленая персиковая тля Myzus persicae, зеленая рисовая цикадка Nephotettix cinticeps, коричневая цикадка Nilaparvata lugens, галлообразующая тля (Pemphigus spp.), хмелевая тля Phorodon humuli, черемуховая тля Rhopalosiphum padi, черная щитовка Saissetia oleae, зеленый жук Schizaphis graminum, зерновая тля Sitobion avenae и оранжерейная белокрылка Trialeurodes vaporariorum.

Примеры Isopodaвключают, помимо прочего: обыкновенную мокрицу-броненосца Armadillidium vulgare и обыкновенную мокрицу Oniscus asellus.

Отряд Lepidoptera включает семейства Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Nymphalidae, Danaidae, Satyridae, Hesperiidae, Sphingidae, Saturniidae, Geometridae, Arctiidae, Noctuidae, Lymantriidae, Sesiidae и Tineidae.

Примеры Lepidopteraвключают, помимо прочего, следующее: Adoxophyes orana (сетчастая листовертка), Agrotis ipsolon (черная совка), Archips podana (листовертка всеядная), Bucculatrix pyrivorella (грушевый минер), Bucculatrix thurberiella (перфоратор листьев

хлопчатника), Bupalus piniarius (сосновый петлитель), Carpocapsa pomonella (плодожорка), Chilo suppressalis (полосатый рисовый мотылек), Choristoneura fumiferana (восточная еловая листовертка), Cochylis hospes (полосатая подсолнечная моль), Diatraea grandiosella (юго-западный кукурузный мотылек), Earls insulana (египетская совка), Euphestia kuehniella (средиземноморская мучная моль), Eupoecilia ambiguella (европейская виноградная моль), Euproctis chrysorrhoea (бурохвостая моль), Euproctis subflava (восточная мотыльковая моль), Galleria mellonella (большая восковая моль), Helicoverpa armigera (хлопковая совка), Helicoverpa zea (хлопковая совка), Heliothis virescens (табачная листовертка), Hofmannophila pseudopretella (коричневая домашняя моль), Homeosoma electellum (подсолнечная моль), Homona magnanima (листовертка чайного дерева восточная), Lithocolletis blancardella (пятнистый щупальцевидный минер), Lymantria dispar (непарный шелкопряд), Malacosoma *neustria (кольчатый коконопряд), Mamestra brassicae* (капустная совка), Mamestra configurata (совка Берта), бражники Manduca sexta и Manuduca quinquemaculata, Operophtera brumata (зимний мотылек), Ostrinia nubilalis (европейский кукурузный мотылек), Panolis flammea (сосновая совка), Pectinophora gossypiella (розовая совка), Phyllocnistis citrella (цитрусовый минер), Pieris brassicae (капустная белая бабочка), Plutella xylostella (ромбовидная моль), Rachiplusia ni (соевый петлитель), Spilosoma virginica (желтая медвежья моль), Spodoptera exigua (свекольная совка), Spodoptera frugiperda (осенняя совка), Spodoptera littoralis (хлопковая листовертка), Spodoptera litura (обыкновенная совка), Spodoptera praefica (желтополосая совка), Sylepta derogata (хлопковая листовертка), Tineola bisselliella (моль платяная), Tineola pellionella (платяная моль), Tortrix viridana (европейская дубовая листовертка), Trichoplusia ni (капустный петлитель) и Yponomeuta padella (мелкая горностаевая моль).

Примеры Orthopteraвключают, помимо прочего, следующее: обыкновенный сверчок *Acheta domesticus, древесная* саранча (Anacridium spp.), перелетная саранча Locusta migratoria, двухполосый кузнечик Melanoplus bivittatus, дифференциальный кузнечик Melanoplus dfferentialis, красноногий кузнечик Melanoplus femurrubrum, перелетный кузнечик Melanoplus sanguinipes, десятипалая медведка Neocurtilla hexadectyla, красная саранча Nomadacris septemfasciata, короткокрылый сверчок Scapteriscus abbreviatus, южный сверчок Scapteriscus borellii, светло-коричневый сверчок Scapteriscus vicinus и пустынная саранча Schistocerca gregaria.

Примеры Phthiraptera включают, помимо прочего, следующее: вошь, кусающая крупный рогатый скот, Bovicola bovis, кусающие вши (Damalinia spp.), кошачья вошь Felicola subrostrata, коротконосая крупная вошь Haematopinus eloysternus, хвостовая вошь Haematopinus quadriperiussus, свиная вошь Haematopinus suis, лицевая вошь Linognathus ovillus, ножная вошь Linognathus pedalis, вошь, кусающая собак, Linognathus setosus, длинноносая бычья вошь Linognathus vituli, куриная вошь Menacanthus stramineus, вошь домашней птицы Menopon gallinae, человеческая вошь Pediculus humanus, лобковая вошь Phthirus pubis, маленькая голубая бычья вошь Solenopotes capillatus и вошь, кусающая собак, Trichodectes canis.

Примеры Psocoptera включают, помимо прочего, следующее: книжная вошь Liposcelis bostrychophila, Liposcelis decolor, Liposcelis entomophila и Trogium pulsatorium.Примеры Siphonaptera включают, помимо прочего, следующее: птичья блоха Ceratophyllus gallinae, собачья блоха *Ctenocephalides canis, кошачья блоха Ctenocephalides fe*lls, человечья блоха Pulex irritans, и восточная крысиная блоха Xenopsylla cheopis.

Примеры Symphyla включают, помимо прочего, следующее: садовый симфилан Scutigerella immaculate.

Примеры Thysanura включают, помимо прочего, следующее: серая чешуйница Ctenolepisma longicaudata, четырехполосная чешуйница Ctenolepisma quadriseriata, обыкновенная чешуйница Lepisma saccharina, и щетинохвостка Thennobia domestica;

Примеры Thysanopteraвключают, помимо прочего, следующее: табачный трипс Frankliniella fusca, цветочный трипс Frankliniella intonsa, западный цветочный трипс Frankliniella occidentalis, хлопковый трипс Frankliniella schultzei, полосатый парниковый трипс Hercinothrips femoralis, соевый трипс Neohydatothrips variabilis, цитрусовые трипсы Келли Pezothrips kellyanus, трипсы авокадо Scirtothrips perseae, дынный трипс Thrips palmi и луковый трипс Thrips tabaci.

Примеры Nematodesвключают, помимо прочего, следующее: паразитические нематоды, такие как галловые, цистовые нематоды и нематоды, вызывающие поражение, в том числе Heterodera spp., Meloidogyne spp. и Globodera spp.; особенно представители цистообразующих нематод, включая, помимо прочего: Heterodera glycines (соевая цистообразующая нематода); Heterodera schachtii (свекловичная цистообразующая нематода); Heterodera avenae (злаковая цистообразующая нематода) и Globodera rostochiensis и Globodera pailida (картофельные цистообразующие нематоды). Нематоды, вызывающие поражение, включают, помимо прочего: Pratylenchus spp.

Другие виды насекомых, восприимчивые к TVP по настоящему изобретению, включают: членистоногих вредителей, которые вызывают опасения для здоровья людей и животных, например, комаров, комаров из родов Aedes, Anopheles и Culex, клещей, блох и мух и т. д.

В одном варианте осуществления инсектицидные композиции, состоящие из TVP или TVP-инсектицидного белка и эксципиента, можно использовать для лечения эктопаразитов. Эктопаразиты включают, помимо прочего: блох, клещей, чесотку, комаров, надоедливых и кусающих мух, вшей и комбинации, включающие один или несколько из вышеперечисленных эктопаразитов. Термин «блохи» включает обычные или случайные виды паразитических блох отряда Siphonaptera, и, в частности, виды Ctenocephalides, особенно C. fells и C.cams, крысиные блохи (Xenopsylla cheopis) и человеческие блохи (Pulex irritans).

Насекомые-вредители по изобретению основных сельскохозяйственных культур включают, помимо прочего: Кукуруза: Ostrinia nubilalis, европейский кукурузный мотылек; Agrotis ipsilon, черная совка; Helicoverpa zea, кукурузный червь; Spodoptera frugiperda, осенняя совка; Diatraea grandiosella, юго-западный кукурузный мотылек; Elasmopalpus lignosellus, малый кукурузный мотылек; Diatraea saccharalis, мотылька

сахарного тростника; Diabrotica virgifera, западный кукурузный корневой червь; Diabrotica longicornis barberi, северный кукурузный корневой червь; Diabrotica undecimpunctata howardi, южный кукурузный корневой червь; Melanotus spp., проволочники; Cyclocephala borealis, северный маскированный майский жук (белая личинка); Cyclocephala immaculata, южный маскированный майский жук (белая личинка); Popillia japonica, японский жук; Chaetocnema pulicaria, кукурузная блошка; Sphenophorus maidis, кукурузный жук; Rhopalosiphum maidis, кукурузная листовая тля; Anuraphis maidiradicis, кукурузная корневая тля; Blissus leucopterus leucopterus, пшеничный клоп; Melanoplus femurrubrum, красноногий кузнечик; Melanoplus sanguinipes, перелетный кузнечик; Hylemya platura, личинка семенной кукурузы; Agromyza parvicornis, кукурузный пятнистый минер; Anaphothrips obscrurus, травяные трипсы; Solenopsis milesta, муравей-вор; Tetranychus urticae, двупятнистый паутинный клещ; Сорго: Chilo partellus, стеблевой мотылек; Spodoptera frugiperda, осенняя совка; Helicoverpa zea, кукурузный червь; Elasmopalpus lignosellus, малый кукурузный мотылек; Feltia subterranea, гранулированная совка; Phyllophaga crinita, белая личинка; Eleodes, Conoderus и Aeolus spp., проволочники; Oulema melanopus, злаковый листоед; Chaetocnema pulicaria, кукурузная блошка; Sphenophorus maidis, кукурузный жук; Rhopalosiphum maidis, кукурузная листовая тля; Sipha flava, желтая тростниковая тля; Blissus leucopterus leucopterus, пшеничный клоп; Contarinia sorghicola, мошка сорго; Tetranychus cinnabarinus, карминовый паутинный клещ; Tetranychus urticae, двупятнистый паутинный клещ; Пшеница: Pseudaletia unipunctata, армейский червь; Spodoptera frugiperda, осенняя совка; Elasmopalpus lignosellus, малый кукурузный мотылек; Agrotis orthogonia, западная совка; Elasmopalpus lignosellus, малый кукурузный мотылек; Oulema melanopus, злаковый листоед; Hypera punctata, долгоносик клеверный лист; Diabrotica undecimpunctata howardi, южный кукурузный корневой червь; русская пшеничная тля; Schizaphis graminum, зеленый жук; Macrosiphum avenae, английская зерновая тля; Melanoplus femurrubrum, красноногий кузнечик; Melanoplus differentialis, дифференциальный кузнечик; Melanoplus sanguinipes, перелетный кузнечик; Mayetiola destructor, гессенская муха; Sitodiplosis mosellana, пшеничная мошка; Meromyza americana, личинка стебля пшеницы; Hylemya coarctata, пшеничная муха; Frankliniella fusca, табачный трипс; Cephus cinctus, стеблевой пилильщик пшеницы; Aceria tulipae, пшеничный курчавый клещ; Подсолнух: Suleima helianthana, подсолнечная моль; Homoeosoma electellum, подсолнечная моль; Zygogramma exclamationis, жук подсолнуха; Bothyrus gibbosus, морковный жук; Neolasioptera murtfeldtiana, семенная мошка; Хлопок: Heliothis virescens, хлопковая листовертка; Helicoverpa zea, хлопковая совка; Spodoptera exigua, свекольная совка; Pectinophora gossypiella, розовая совка; Anthonomus grandis, долгоносик; Aphis gossypii, хлопковая тля; Pseudatomoscelis seriatus, хлопковая блоха; Trialeurodes abutilonea, полосатая крылатая белокрылка; Lygus lineolaris, потускневший растительный жук; Melanoplus femurrubrum, красноногий кузнечик; Melanoplus differentialis, дифференциальный кузнечик; Thrips tabaci, луковый трипс; Franklinkiella fusca, табачный трипс; Tetranychus cinnabarinus,

карминовый паутинный клещ; Tetranychus urticae, двупятнистый паутинный клещ; Рис: Diatraea saccharalis, сахарный тростник; Spodoptera frugiperda, осенняя совка; Helicoverpa zea, кукурузный червь; Colaspis brunnea, виноградный жук-листоед; Lissorhoptrus oryzophilus, рисовый водяной долгоносик; Sitophilus oryzae, рисовый долгоносик; Nephotettix nigropictus, рисовая цикадка; Blissus leucopterus, пшеничный клоп; Acrosternum hilare, зеленый клоп-вонючка; Соя: Pseudoplusia includens, соевая петлелица; Anticarsia gemmatalis, гусеница бархатной фасоли; Plathypena scabra, зеленый клеверный червь; Ostrinia nubilalis, европейский кукурузный мотылек; Agrotis ipsilon, черная совка; Spodoptera exigua, свекольная совка; Heliothis virescens, хлопковая листовертка; Helicoverpa zea, хлопковая совка; Epilachna varivestis, мексиканский бобовый жук; Myzus persicae, зеленая персиковая тля; Empoasca fabae, картофельная цикадка; Acrosternum hilare, зеленый клоп-вонючка; Melanoplus femurrubrum, красноногий кузнечик; Melanoplus differentialis, дифференциальный кузнечик; Hylemya platura, личинка-вредитель кукурузы; Sericothrips variabilis, соевый трипс; Thrips tabaci, луковый трипс; Tetranychus turkestani, клубничный паутинный клещ; Tetranychus urticae, двупятнистый паутинный клещ; Ячмень: Ostrinia nubilalis, европейский кукурузный мотылек; Agrotis ipsilon, черная совка; Schizaphis graminum, зеленый жук; Blissus leucopterus leucopterus, пшеничный клоп; Acrosternum hilare, зеленый клоп-вонючка; Euschistus servus, коричневый клоп-вонючка; Delia platura, личинка-вредитель кукурузы; Mayetiola destructor, гессенская муха; Petrobia latens, коричневый пшеничный клещ; Масличный рапс: Brevicoryne brassicae, капустная тля; Phyllotreta cruciferae, блошка крестоцветная; Mamestra configurata, совка Берта; Plutella xylostella, алмазная моль; Delia ssp., корневые личинки.

В некоторых вариантах осуществления инсектицидные композиции можно применять для обработки комбинаций, включающих одного или более из вышеуказанных насекомых.

Насекомые, чувствительные к пептидам по настоящему изобретению, включают, помимо прочего: семейства, такие как: Blattaria, Coleoptera, Collembola, Diptera, Echinostomida, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Orthoptera, Rhabditida, Siphonoptera, Thysanoptera.

Рода-виды обозначены следующим образом: Actebia-fennica, Agrotis-ipsilon, A.-segetum, Anticarsia-gemmatalis, Argyrotaenia-citrana, Artogeia-rapae, Bombyx - mori, Busseola-fusca, Cacyreus-marshall, Chilo-suppressalis, Christoneura-fumiferana, C.-occidentalis, C.-pinus pinus, C.-rosacena, Cnaphalocrocis-medinalis, Conopomorpha-cramerella, Ctenopsuestis-obliquana, Cydia-pomonella, Danaus- plexippus, Diatraea-saccharallis, D.-grandiosella, Earias-vittella, Elasmolpalpus-lignoselius, Eldana-saccharina, Ephestia-kuehniella, Epinotia-aporema, Epiphyas-postvittana, Galleria-mellonella, *Рода-Виды*, Helicoverpa-zea, H.-punctigera, H.-armigera, Heliothis-virescens, Hyphantria- cunea, Lambdina-fiscellaria, Leguminivora-glycinivorella, Lobesia-botrana, Lymantria-dispar, Malacosoma-disstria, Mamestra-brassicae, M. configurata, Manduca-sexta, Marasmia-patnalis, Maruca-vitrata, Orgyia-leucostigma, Ostrinia-nubilalis, O.-furnacalis, Pandemis-pyrusana, Pectinophora-gossypiella, Perileucoptera-coffeella, Phthorimaea-operculella, Pianotortrix-octo,

Piatynota-stultana, Pieris-brassicae, Plodia-interpunctala, Plutella-xylostella, Pseudoplusia-includens, Rachiplusia-nu, Sciropophaga-incertulas, Sesamia-calamistis, Spilosoma- virginica, Spodoptera-exigua, S.-frugiperda, S.-littoralis, S.-exempta, S.-litura, Tecia-solanivora, Thaumetopoea-pityocampa, Trichoplusia-ni, Wiseana-cervinata, Wiseana-copularis, Wiseana-jocosa, Blattaria-Blattella, Collembola-Xenylla, C.-Folsomia, Echinostomida-Fasciola, Hemiptera-Oncopeltrus, He.-Bemisia, He.-Macrosiphum, He.-Rhopalosiphum, He.-Myzus, Hymenoptera-Diprion, Hy.-Apis, Hy.-Macrocentrus, Hy.-Meteorus, Hy.-Nasonia, Hy.-Solenopsis, Isopoda-Porcellio, Isoptera-Reticulitermes, Orthoptera-Achta, Prostigmata-Tetranychus, Rhabitida-Acrobeloides, R.-Caenorhabditis, R.-Distolabrellus, R.-Panagrellus, R.-Pristionchus, R.-Pratylenchus, R.-Ancylostoma, R.-Nippostrongylus, R.-Panagrellus, R.-Haemonchus, R.-Meloidogyne и Siphonaptera-Ctenocephalides.

В настоящем изобретении предложены способы трансформации растений, которые можно использовать для трансформации любых видов растений, включая, помимо прочего, однодольные и двудольные растения. Культуры, для которых трансгенный подход или средства защиты, инкорпорированные в растения (PIP), были бы особенно пригодным подходом, включают, помимо прочего: люцерну, хлопок, томат, маис, пшеницу, кукурузу, сладкую кукурузу, люцерну, сою, сорго, полевой горох, льняное семя, сафлор, рапс, масличный рапс, рис, сою, ячмень, подсолнечник, деревья (в т.ч. хвойные и лиственные), цветы (в т.ч. выращиваемые в коммерческих целях и в теплицах), полевой люпин, просо, сахарный тростник, картофель, помидоры, табак, крестоцветные, перец, сахарную свеклу, ячмень и рапс, Brassica sp., рожь, просо, арахис, сладкий картофель, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливки, папайю, кешью, макадамию, миндаль, овес, овощи, декоративные и хвойные растения.

В некоторых вариантах осуществления композиции и/или способы по настоящему изобретению могут быть применены к очагу насекомого и/или вредителя, выбранного из группы, состоящей из: петлители; всеядные листоверты; бражники; белянка репная; алмазная моль; гипена скабра; американская белая бабочка; солончаковая гусеница; гусеницы; совки; капустница поперечно-полосатая; американская кукурузная совка; бархатная гусеница; соевый петлитель; томатный плодовый червь; пестрая совка; дынные черви; комплекс личинок; листовертка фруктового дерева; цитрусовая совка; Heliothis; парусник кресфонтес; цитрусовые совки; красногорбая гусеница; кольчатый коконопряд; осенний бражник; ореховая гусеница; плодовые черви; непарный шелкопряд; листовертка пестрая; краснополосая листовертка; хохлатый яблоневый мотылек; восточная плодовая моль; листовертка фундука; листовертка косополосая; яблоневая моль; бурильщик веток; скелетонизатор виноградного листа; виноградная листовертка; сфинкс-мотылек (бражник); оранжевая мотылек; табачная листовертка; виноградная ягодная моль; проволочный червь; гусеница люцерны; хлопковая совка; бражник «мертвая голова»; мотылек аморбия; всеядный петлитель; элло-мотылек (бражник); сатурния ио; мотылек олеандра; гусеница азалии; бражник; листовертки; банановый шкипер; Batrachedra

comosae (Hodges); мотылек Текла; артишоковая моль; чертополоховая бабочка; мешочница; весенний и осенний плодовые черви; вязовый проволочный червь; калифорнийский дубовый червь; сосновая бабочка; еловые листовертки; оседланная видная моль; пихтовая моль Дугласа; западная мотыльковая моль; черноголовая листовертка; паутинный червь-мимоза; сосновый червь; седловая гусеница; зеленополосый кленовый червь или гусеница болиголова.

В некоторых вариантах осуществления композиции и/или способы по настоящему изобретению можно применять к очагу насекомого и/или вредителя, выбранного из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia unipuncta*); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего

анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni или Xanthogaleruca luteola.

В некоторых вариантах осуществления композиции и/или способы по настоящему изобретению могут быть применены к очагу взрослого жука, выбранного из группы, состоящей из: азиатского садового жука (Maladera castanea); золотого пятнистого дубового буравчика (Agrilus coxalis auroguttatus); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); восточного жука (Anomala orientalis) и мыльного точильщика (Agrilus prionurus).

В некоторых вариантах осуществления композиции и/или способы по настоящему изобретению могут быть применены к очагу насекомого и/или вредителя, который представляет собой личинку (однолетнюю белую личинку), выбранную из группы, состоящей из: однолетнего голубого травяного долгоносика (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); европейского майского жука (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука в маске (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida) и клопа (Curculionoidea).

ПРИМЕРЫ

Примеры в этом описании не предназначены и не должны использоваться для

ограничения изобретения; они предоставлены только для иллюстрации изобретения.

Пример 1: Получение вектора экспрессии TVP

ДНК-конструкцию различных TVP оптимизировали по кодонам и синтезировали в виде слитой с пре-/про-последовательностью альфа-фактора спаривания Kluyveromyces lactis (αMF) и лигировали в сайты рестрикции NotI и HindIII pKlac1 (New England Biolabs). Вектор расщепляли SacII для линеаризации и удаления бактериального Ori и маркера селекции, затем электропорировали в электрокомпетентные клетки Kluyveromyces lactis. Трансформанты с множественными копиями гена отбирали на чашках для селекции, содержащих ацетамид в качестве единственного источника азота. Клоны, экспрессирующие TVP, оценивали с помощью ВЭЖХ на колонке Chromolith C18 (4,6×100 мм) и элюировали при скорости потока 2 мл мин-1 и градиенте 15-33% ацетонитрила в течение 8 мин. **ФИГ. 1.**

Пример 2: Расщепление TVP и аланиновое сканирование основных аминокислот

Для определения стабильности TVP при воздействии протеаз кишечника чешуекрылых. Вкратце, Manduca sexta 5-го возраста препарировали, делая небольшой разрез в слизистой оболочке кишечника, чтобы содержимое кишечника можно было собрать в пробирку. Множественные срезы объединяли и хранили на льду для немедленного использования, или хранили при температуре -80°C для использования в будущем. Затем выделенную среднюю кишку (далее называемую кишечным экстрактом Manduca или MGE, англ.: Manduca Gut Extract) подвергали анализу на расщепление. Затем 1 мг/мл TVP инкубировали с 0,1 мг/мл бычьего трипсина или разбавленным 1/10 MGE с 50 мМ Трис-HCl, pH 8,8 для поддержания щелочного pH. Были взяты временные точки, и гидролизат гасили добавлением 200 мМ HCl. Деградацию количественно оценивали с помощью анализа ВЭЖХ, а уровни определяли путем подгонки к однократному экспоненциальному затуханию.

Кишечник чешуекрылых содержит трипсиноподобные протеазы, которые разрезают аминокислоты Arg или Lys; не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, мы предположили, что единичная мутация этих аминокислот в аланин может идентифицировать сайт(ы), которые вызывают деградацию в кишечнике чешуекрылых. Чтобы проверить вышеизложенную гипотезу, TVP были созданы путем индивидуальной мутации каждой основной аминокислоты в аланин, присутствующий в аминокислотной последовательности Ta1b дикого типа. Затем стабильность каждого из этих TVP оценивали путем сопоставления TVP с условиями расщепления, как описано выше. В результате этого эксперимента было выявлено, что замена аргинина в аминокислотном положении 9 на аланин (R9A) полностью отменяла расщепление трипсином, тогда как замены K18A и R38A давали умеренное, хотя и значительное снижение расщепляемости. Соответственно, R9A и R38A дополнительно оценивали на устойчивость к протеазам кишечника чешуекрылых в анализе MGE, и было обнаружено, что мутации стабилизируют Ta1b в 247 и 8,6 раз, соответственно. *См.* Таблицу 3.

Таблица 3. Анализ расщепления с помощью аланинового сканирования

основных аминокислот.

	Период полужизни (мин)			
Мутант	**Бычий трипсин**	**Кишечный экстракт Manduca (MGE)**	**Кратность изменения (трипсин)**	**Кратность изменения (MGE)**
Ta1b ДТ	288	1,5	--	--
R7A	132	не испытано	0,5	не испытано
R9A	>6000	370	>20	247
K13A	294	не испытано	1,0	не испытано
K18A	1194	не испытано	4,1	не испытано
R38A	1860	19	6,5	8,6

Пример 3: Комбинаторный пептидный скрининг последовательностей, устойчивых к протеазам кишечника насекомых

Скрининг библиотеки пептидов на основе FRET для выявления положений, которые могут снижать расщепление в присутствии протеаз кишечника чешуекрылых. Анализ FRET проводили с использованием имеющегося в продаже набора FRET (кат. № PSREPLI005, Mimotopes, Victoria, Австралия). Анализ FRET представляет собой следующее: библиотеку пептидов, соединенную с молекулами FRET (краситель и гаситель), использовали в качестве репортерных анализов для идентификации пептидов, которые расщепляются либо в кишечной среде насекомого, либо в моделируемой среде желудочно-кишечного тракта человека. Вкратце, набор FRET содержит пулы молекул FRET с участком из 3 вариабельных аминокислотных последовательностей, заключенных в скобки серией аминокислот глицина, присоединенных либо к красителю, либо к гасителю. Каждая молекула FRET не дает сигнала, если вариабельная область не расщеплена, но может быть возбуждена, если молекула расщеплена. Скорость, с которой происходит расщепление (т. е. специфичность последовательности для протеаз), можно ранжировать по скорости появления флуоресцентного сигнала во времени (т. е. наклону).

Используемый набор FRET содержит 512 пулов, содержащих до 8 различных молекул FRET в каждом пуле. Реакция FRET является очень высокоэффективной: ферменты добавляют в планшет с объединенным материалом с помощью многоканальной загрузочной пипетки, а затем планшет считывают раз в минуту для обнаружения флуоресценции. Результат обнаружения флуоресценции записывается для каждой реакции.

Образцы FRET готовили непосредственно перед анализом в соответствии с рекомендациями производителя (добавьте 5 мкл 50% ацетонитрила в воде в каждую лунку и встряхните планшет на шейкере в течение 5 минут; затем добавьте 45 мкл буфера для анализа и снова встряхните в течение 5 минут). К этому моменту пулы FRET были готовы к добавлению 50 мкл рабочего раствора фермента для начала реакций. С помощью

многоканальной пипетки-повторителя в каждую лунку добавляли 50 мкл рабочего раствора фермента (для каждого из протестированных типов ферментов), а затем планшет сразу же помещали в планшет-ридер (планшет-ридер SpectraMax с программным обеспечением SoftMax Pro 6.0, Molecular Devices, Sunnyvale CA) и эмиссию считывали с использованием настройки возбуждения 320 нм, эмиссии 420 нм с пороговым значением 420 нм. Показания снимали каждую 1 минуту в течение 15 минут. После того, как планшеты были готовы, их запечатывали алюминиевым герметиком и хранили при -80°C.

Чтобы протестировать расщепление пула FRET ферментами кишечника чешуекрылого вредителя, ферменты кишечника выделяли из кукурузного червя (Helicoverpa zea). Насекомые-кукурузные черви были получены коммерческим путем от Benzon Research (Карлайл, Пенсильвания) в виде яиц. Вылупившихся личинок выращивали на искусственной диете до 4/5-го возраста (длиной 20 мм), после чего выделяли кишки. Перед извлечением кишечника личинок анестезировали CO_2. Затем личинку прикрепляли к пластине для вскрытия за голову и хвост. С помощью ножниц для препарирования надрезали кутикулу. Затем в надрез вставляли ножницы для препарирования, и разрезали кутикулу вдоль насекомого. Затем кутикулу осторожно оттягивали и закрепляли, открывая пищеварительный тракт. Используя деионизированную воду, насекомое тщательно промывали для удаления гемолимфы. Затем кишечник вырезали пинцетом и помещали в раствор 500 мкл 200 мМ трис-HCl, pH 8,1, 150 мМ NaCl (буфер для анализа). Пробирку взвешивали до и после для расчета общего количества добавленного кишечника. Кишечник кукурузного червя разводили до исходной концентрации 7 мг/мл (10x) в 200 мМ трис-HCl, pH 8,1, 150 мМ NaCl. Каждый планшет разбавляли в 20 раз свежим буфером для анализа. С помощью многоканальной пипетки-повторителя в каждую лунку добавляли 50 мкл 1X кишечного экстракта и сразу считывали, как описано выше.

Затем наборы FRET были протестированы в среде, имитирующей протеазу в кишечнике чешуекрылых, и данные были восстановлены. В Таблице 11 показаны результаты комбинаторного скрининга пептидов с выделением аминокислотных замен в положениях P2, P1, P1’ и P2’, где P1 соответствует положению R9. Библиотека не содержит метионина, поэтому предполагалось, что сходные аминокислоты лейцин и изолейцин приблизительно соответствуют расщепляемости M10 (положение P1’). Несколько мутаций (показаны в Таблице 4 жирным шрифтом) проявляли повышенную стабильность в присутствии протеаз чешуекрылых, и некоторые из них были дополнительно охарактеризованы в отношении стабильности и активности в Ta1b.

Таблица 4. Кратное снижение уровня расщепления пептидов.

	P2	P1	P1'	P2'
	A	R	M	T
A/V	--	**5,1**	0,9	0,9
D/E	**3,4**	**58,1**	0,9	**3,0**

F/Y	1,7	**2,7**	0,5	0,7
I/L	1,8	**33,9**	--	0,7
K/R	**3,0**	--	0,6	0,6
N/Q	**3,6**	**10,8**	0,7	1,4
P	**305,3**	**5,1**	**18,5**	**9,9**
S/T	**3,3**	**9,0**	0,6	--

Стабильность мутантов и профилирование активности

Мутации на основе FRET были включены в TVP и оценены на стабильность и активность протеазы. Поскольку положение R9 оказалось важным для активности остатком фармакофора, мы отдали предпочтение консервативным мутациям с большими полярными боковыми цепями, которые с большей вероятностью сохранят аналогичный профиль активности в этом положении. Примерный способ FRET-скрининга описан в патентной заявке США № 15/727277, с названием «Cleavable Peptides and Insecticidal and Nematicidal Proteins Comprising Same», содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Комбинаторная библиотека содержит три рандомизированные аминокислоты, окруженные глицинами, с парой краситель/гаситель FRET на N- и C-концах. Расщепление пептида приводит к увеличению сигнала, пропорциональному степени расщепления, и позволяет ранжировать чувствительность различных пептидных последовательностей к кишечным протеазам. Комбинаторную библиотеку подвергали расщеплению в присутствии кишечного экстракта Helicoverpa zea, который выделяли таким же образом, как и в вышеупомянутом методе с MGE.

TVP оценивали на стабильность в присутствии MGE (как описано выше). Активность оценивали путем инъекции комнатным мухам (Musca domestica): 0,5 инъецировали внутригрудно комнатным мухам со средней массой 18 мг. Дозу, необходимую для 50% нокдауна и смертности, определяли через 24 часа после инъекции.

Из протестированных TVP несколько мутантов отрицательно влияли на активность. Тем не менее, некоторые TVP были способны поддерживать активность, сходную с активностью нативного Ta1b, например, TVP со следующими заменами: A8S, R9N, R9Q и T11P показали значительное снижение расщепляемости кишечным экстрактом Manduca (MGE), что согласуется с результатами комбинаторной пептидной библиотеки.

Для оценки активности мутаций аланина TVP с мутациями R38A и R9A инъецировали в дорсальную внутригрудную область взрослых комнатных мух. R38A не показал никакого снижения активности по сравнению с Ta1b дикого типа, но R9A имел 9-кратное снижение активности. *См.* Таблицу 5.

Таблица 5. Стабильность мутантов и профилирование активности.

Мутант	**Кратное улучшение стабильности**	**Кратное снижение активности**

Мутант	Кратное улучшение стабильности	Кратное снижение активности
A8D	не испытано	>10
A8N	1,8	не испытано
A8P	не испытано	>10
A8S	12,1	1,3
R9A	247	8,7
R9E	не испытано	>10
R9H	16,2	2,5
R9N	>50	1,5
R9Q	>50	0,8
T11D	не испытано	>10
T11P	92,9	1,4
R38A	8,6	1,0

Пример 4: Анализ с инъекцией комнатной мухе

Активность TVP, идентифицированных в анализе стабильности мутантов, оценивали путем инъекции комнатным мухам (Musca domestica). Ta1b дикого типа и TVP с аминокислотными заменами в положениях R9Q и R9N вводили внутригрудно комнатным мухам с средней массой 18 мг при инъекционной дозе 0,5 мкл токсина или контроля. Затем через 24 часа после инъекции определяли дозу TVP, необходимую для 50% нокдауна (KD_{50}). Результаты этого эксперимента показывают, что TVP с R9Q более активен по сравнению с Ta1b дикого типа, на что указывает более низкая доза, необходимая для достижения KD_{50} и у комнатных мух (контрольные образцы с использованием воды и CO_2 не показали эффекта нокдауна). **ФИГ. 2**.

Пример 5: Анализ выживания трипсов

Дикие популяции западного цветочного трипса (Frankliniella occidentalis) были собраны с выращенных в теплице Phlox paniculata. Необработанный контроль (UTC, англ.: untreated control) воды или 400 мкг токсина наносили на фильтровальную бумагу 8×33 мм (85,6 мкг/см^2) и помещали в герметичные контейнеры с трипсами и 10% сахарозой в качестве пищи. Затем измеряли смертность трипсов через четыре дня.

Анализ выживаемости трипсов показал, что смертность в необработанном контроле (UTC) и U1-агатоксин-Ta1b дикого типа составила 12,5%; однако использование TVP с аминокислотными заменами в положениях R9Q приводило к 100% смертности. **ФИГ. 3**.

Пример 6: Посттрансляционная модификация TVP в K. lactis

TVP, экспрессируемые и секретируемые K. lactis, подвергаются посттрансляционным модификациям. Чтобы лучше понять эту посттрансляционную модификацию, TVP-R9Q вводили в колонку Chromolith C18 (4,6×100 мм) и элюировали

при скорости потока 2 мл мин-1 и градиенте 15-33% ацетонитрила в течение 8 мин. Затем масс-спектры собирали на приборе ESI LC-TOF Micromass LCT (Waters).

Посттрансляционная модификация, происходящая в TVP, подтверждается сдвигом массы на +162 Да. **ФИГ. 4.** Существует большая вероятность того, что это посттрансляционное событие представляет собой гликозилирование, в частности, O-связанное маннозилирование остатка серина или треонина. На **ФИГ. 4** показан результат хроматограммы ВЭЖХ TVP-R9Q, показывающий плечо на пике TVP (обозначено черной стрелкой). **На ФИГ. 5** показаны масс-спектры TVP-R9Q. Деконволюция многозарядных частиц (вставка) вычисляет массы 5732 и 5894 Да. Ожидаемая молекулярная масса полностью окисленного TVP-R9Q составляет 5731,3 Да. **ФИГ. 5.**

Пример 7: Удаление сайта гликозилирования и защита C-конца

Чтобы дополнительно охарактеризовать варианты TVP, был проанализирован эффект удаления предполагаемого сайта гликозилирования и защитные эффекты, которые дает C-концевая аминокислота. Варианты TVP вводили в колонку Chromolith C18 (4,6×100 мм) и элюировали при скорости потока 2 мл мин-1 и градиенте 15-33% ацетонитрила в течение 8 мин. Масс-спектры собирали на приборе ESI LC-TOF Micromass LCT (Waters).

Были проанализированы следующие TVP: (1) TVP-R9Q; (2) TVP-R9QΔG; (3) TVP-R9Q/T43A/ΔG; (4) TVP-R9Q/T43A и (5) TVP-R9Q/T43A/ΔK-G. Ожидаемые/наблюдаемые результаты масс-спектров для молекулярных масс вышеупомянутых TVP представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Ожидаемая/наблюдаемая молекулярная масса TVP.

Последовательность	**Ожидаемая молекулярная масса**	**Наблюдаемая молекулярная масса**
(1) TVP-R9Q	5731,3	5732
(2) TVP-R9QΔG		
(3) TVP-R9Q/T43A/ΔG	5644,2	5645
(4) TVP-R9Q/T43A	5701,3	5702
(5) TVP-R9Q/T43A/ΔK-G	5516,0	5516

Предполагаемое событие гликозилирования подтверждается, как показано с помощью ВЭЖХ TVP-R9Q, и на что указывает пик левого плеча. **ФИГ. 6**. Удаление C-концевого глицина из Ta1b (например, TVP-R9QΔG и TVP-R9Q/T43A/ΔG) приводит к частичному протеолизу концевого лизина (K50) во время экспрессии в K. lactis. **ФИГ. 7-8**.

Один вид TVP может быть экспрессирован, когда концевой глицин добавлен обратно (например, TVP-R9Q/T43A) или концевой лизин также удален (TVP-R9Q/T43A/ΔK-G). **ФИГ. 9** и **10**.

На ФИГ. 11-14 показаны результаты анализа ESI-MS, показывающие масс-спектры (1) TVP-R9Q; (2) TVP-R9QΔG; (3) TVP-R9Q/T43A/ΔG; (4) TVP-R9Q/T43A и (5) TVP-R9Q/T43A/ΔK-G.

Пример 8: Анализ с инъекцией комнатной мухе с использованием TVP после удаления сайта гликозилирования

TVP: (1) TVP-R9Q; (2) TVP-R9QΔG; (3) TVP-R9Q/T43A/ΔG; (4) TVP-R9Q/T43A и (5) TVP-R9Q/T43A/ΔK-G анализировали в анализе с инъекцией комнатной мухе. Инъекции комнатной мухи выполняли, как описано ранее в данном документе. В Таблице 7 показаны результаты анализа с инъекцией комнатной мухе. В данном случае все TVP показали более высокую активность по сравнению с Ta1b ДТ.

Таблица 7. Результаты анализа с инъекцией комнатной мухе.

Протестированный пептид	**Муха, KD_{50} (пмоль/г)**
Дикий тип	167
TVP-R9Q	149
TVP-R9Q/ΔG	136
TVP-R9Q/T43A/ΔG	157
TVP-R9Q/T43A	180
TVP-R9Q/T43A/ΔK-G	157

В данном случае удаление сайта гликозилирования и С-концевых аминокислот (т. е. ΔG и/или ΔK-G) привело к получению пептидов с более высокой активностью по сравнению с Ta1b ДТ. **ФИГ. 15.**

Пример 9: Биоанализ кукурузного червя

Для сравнения Ta1b ДТ и TVP-R9Q был проведен инъекционный и пероральный биоанализ листвы. В данном случае оценивали влияние Ta1b ДТ и TVP-R9Q на смертность кукурузных червей. Результаты инъекционных и пероральных биоанализов показаны в таблице ниже.

Во-первых, Ta1b ДТ (ДТ) и мутант R9Q Ta1b (TVP-R9Q) оценивали в анализе с инъекцией чешуекрылым. Экспериментальная группа состояла из 8 инъецированных особей кукурузного червя (Helicoverpa zea) на дозу пептида. Было четыре экспериментальных повтора на пептид. Перед инъекцией личинки кукурузного червя выращивали до их четвертого возраста на стандартном рационе для чешуекрылых. Личинок взвешивали для точного расчета дозы. Точные дозы незначительно различались между повторами из-за различий в массе личинок кукурузного червя, но примерные дозы инъекций составляли: 1000, 2000, 4000 и 8000 пмоль/г. Инъекции выполняли с помощью ручного микроаппликатора и шприца с иглой 30 размера. Личинок инъецировали в основание одной из их самых задних ложноножек. Личинкам вводили 1 мкл раствора обработки.

После инъекции личинок помещали в лунку 32-луночного лотка, наполненного 5 мл стандартного рациона для чешуекрылых. Затем лотки помещали в инкубатор при 28°C. Состояние личинок оценивали через 24 часа после инъекции. Личинки оценивали как «живые» или «нокдаунные», где живые особи нормально двигались, нормально питались

и нормально реагировали на зондирование; у нокаутированных особей не было координированных движений, они не могли есть и не реагировали на зондирование.

В пероральном лиственном биоанализе экспериментальная единица состояла из 12 листовых дисков (в расчете на концентрацию пептида), опрысканных (спереди и сзади) общим объемом распыления 5,5 мл (по 2,75 мл с каждой стороны), которыми кормили новорожденных кукурузных червей (Helicoverpa zea). Было четыре экспериментальных повтора на пептид.

Салат ромэн нарезали на диски диаметром 30 мм, а затем стерилизовали, используя раствор отбеливателя с концентрацией 140 частей на миллион; затем диски трижды промывали в воде. Затем диски салата ромэн прикрепляли к плите из пенополистирола и опрыскивали заданной обработкой; диски переворачивали, снова опрыскивали, давали высохнуть и помещали на арену.

Арена представляла собой 32-луночный лоток для выращивания, содержащий 5 мл 1% агара. В каждую лунку помещали по одному диску салата ромэн и по одному кукурузному червю первого возраста (Helicoverpa zea) на листовой диск. Затем лотки помещали в инкубатор при 28°C.

Смертность кукурузных червей оценивали на четвертые сутки после опрыскивания и нанесения личинок на листовые диски. Личинки оценивались как живые (нормально двигающиеся и питающиеся) или мертвые (неподвижные, обесцвеченные).

Результаты инъекционных и пероральных биоанализов показаны в таблице ниже.

Таблица 8. Инъекционный и пероральный анализ смертности. ДТ=дикий тип. Ошибка показана как стандартная ошибка среднего (n=3). «ppt»=часть на тысячу.

Название	**Инъекция**	**Пероральный биоанализ**
	LD_{50} (пмоль/г)	% смертности на 3 ppt
ДТ	2933 ± 827	6 ± 3
TVP-R9Q	3406 ± 516	21 ± 7

Пример 10: Стабильность составов

Стабильность жидкого концентрата

Состав жидкого концентрата (ЖК) оценивали при различных температурах с течением времени. Состав ЖК, содержащий 2% TVP-R9Q/T43A; 0,03% бензизотиазолинона (БИТ); 2% сорбита; а оставшееся количество состава ЖК представляло собой ферментированное пиво, т.е. концентрат клеток, отделенных от ферментированного пива, оценивали с помощью ВЭЖХ для определения стабильности TVP-R9Q/T43A при различных температурах и с течением времени. Оцениваемые температуры составляли 4°C, 21°C, 37°C, 45°C и 54°C. Оцениваемое время составляло 0, 16, 31, 42, 98 и 114 дней.

Как показано на **ФИГ. 16**, жидкие составы быстро разлагаются при температурах, соответствующих полевым условиям.

Анализ стабильности порошка, высушенного распылением (SDP, англ.: spray dried

powder)

Стабильность TVP-R9Q/T43A затем оценивали в форме порошка, высушенного распылением (SDP). В данном случае состав SDP был создан из высушенного ферментированного пива: вкратце, ферментированного пиво было взято из реактора, сконцентрировано и высушено распылением с удалением всей воды. Стабильность TVP-R9Q/T43A в SDP оценивали с помощью ВЭЖХ для количественного определения количества TVP-R9Q/T43A в мг/мл при 21°C, 37°C и 45°C с пакетом поглотителя кислорода/влаги и без него (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., продукт № AS-100; 655 3rd Ave # 24, New York, NY 10017 USA), через 0, 7, 14, 28, 42 и 62 дня.

Как показано на **ФИГ. 17**, TVP-R9Q/T43A в твердом состоянии значительно более стабилен по сравнению с жидким состоянием (сравните с **ФИГ. 16** выше). Кроме того, инкубация с пакетами поглотителей кислорода/влаги дополнительно повысила стабильность TVP-R9Q/T43A. **ФИГ. 17**.

Использование пакета поглотителя кислорода/влаги во время дальнейшего повышения стабильности. В данном случае пакет был запечатан внутри майларового пакета с образцом перед тестированием. После инкубации в течение 62 дней при 21°C количество TVP-R9Q/T43A (мг/мл) с пакетом поглотителя кислорода/влаги уменьшилось на 3,5% по сравнению со снижением на 15,4%, наблюдаемым в TVP-R9Q/T43A без пакета поглотителя кислорода/влаги. **ФИГ. 17**. Точно так же после 62 дней при 37°C снижение TVP-R9Q/T43A с пакетом поглотителя кислорода/влаги составило 13,0% по сравнению со снижением на 19,5%, наблюдаемым без пакета поглотителя кислорода/влаги. Наконец, после 62 дней при 45°C снижение TVP-R9Q/T43A с пакетом поглотителя кислорода/влаги составило 24,7% по сравнению со снижением на 29,5%, наблюдаемым без пакета поглотителя кислорода/влаги. В данном случае деградация пептида увеличивается с повышением температуры. **ФИГ. 17**.

Пример 11: Предварительный анализ стабильности с дополнительными эксципиентами

Стабильность составов

Специалистам в данной области техники будет понятно, что комбинация длинноцепочечных и короткоцепочечных сахаридов с высокими температурами стеклования (Tg) способствует низкой подвижности (например, α-релаксации и β-релаксации). *См.* Mensink et al., How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions**.** Eur J Pharm Biopharm. 2017 May;114:288-295.

Анализ деградации проводили для оценки предварительной стабильности составов. Компоненты составов для предварительной стабилизации представлены в таблице ниже. Составы тестировали при 54°C, 37°C и 21°C в течение 2 недель. Результаты анализа предварительной стабильности показаны на **ФИГ. 18.**

Таблица 9. Предварительная стабильность составов. Количества указаны в граммах (% масс./масс.); «-» указывает на отсутствие ингредиента.

№ состава	SDP	ЖК масс./БИТ	Лигносульфонат	Гипс	Мальтодекстрин	Трегалоза	Мальтоза	H_2O
7	320	-	40	-	40	-	-	244
18		425	-	-	150	75	-	
21	200	-	40	40		200	-	241
2-1	-	425	-	-	150	150	-	-
2-2	-	425	-	-	150	75	75	-
2-3	-	425	-	-	150	-	150	-

Пример 12: Совместимость бензизотиазолинона (БИТ) с TVP

Два сухих состава - состав отделенного от клеток и концентрированного ферментированного пива, содержащего TVP-R9Q/T43A, и состав SDP - были оценены на совместимость с БИТ. Был получен состав отделенного от клеток и концентрированного ферментированного пива с TVP-R9Q/T43A, как описано выше. Состав SDP получали из ферментированного пива следующим образом: использовали распылительную сушилку Buchi (модель B-290) при следующих условиях: температура на входе: 160°C; температура на выходе: 65-70°C; скорость насоса: 35-40 об/мин; падение давления: 45-50 фунтов на кв. дюйм; аспиратор установлен на 100% и давление распыления 50 фунтов на кв. дюйм.

Образцы оценивали при T0 (время сразу после приготовления и сушки распылительной сушилкой при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе. Каждый состав тестировали при 4°C, 21°C, 37°C и 45°C.

Как показано на **ФИГ. 19**, использование БИТ снижало стабильность TVP-R9Q/T43A, когда он был приготовлен в твердом состоянии и когда его использовали без других добавок.

Однако, как показано на **ФИГ. 20**, когда состав сушили распылением и комбинировали с БИТ, наблюдалось снижение стабильности TVP с течением времени, что усугублялось более высокими температурами. **На ФИГ. 20**.

БИТ обычно используют в качестве противомикробного средства. Однако, как показано в данном документе, использование БИТ привело к деградации TVP при распылительной сушке. **ФИГ. 19-20.**

Пример 13: Проверка стабильности pH

Проверка стабильности pH был проведен для определения влияния pH на стабильность TVP-R9Q/T43A. В данном случае 1 часть на тысячу (ppt) TVP-R9Q/T43A инкубировали при различных значениях pH с использованием набора Slice pH (Hampton Research, кат. № HR2-070; 34 Journey Aliso Viejo, CA 92656-3317 USA). TVP-R9Q/T43A инкубировали при 45°C в течение 7 дней и анализировали с помощью ВЭЖХ для

определения процента оставшегося пептида. Как показано на **ФИГ. 21**, было определено, что оптимальный pH составляет от 6,5 до 7,5.

Обычные консерванты, используемые для предотвращения микробного загрязнения, включают, среди прочего, бензоаты, пропионаты и сорбаты. Выбор консерванта сильно зависит от pH. Как правило, эффективный верхний предел pH составляет около 4,5 для бензоатов; около 5,5 для пропионатов и около 6,5 для сорбатов. В некоторых вариантах осуществления при использовании при уровнях pH, например, слабокислых продуктов (pH 5,5-6,0), сорбаты (в отличие от бензоатов или пропионатов) более эффективны против более широкого спектра вредоносных микроорганизмов.

Пример 14: Консерванты и микробное образование

Несколько различных комбинаций консервантов оценивали для определения их влияния на микробную контасинацию. Состав 2% TVP-R9Q/T43A, полученный из ферментированного пива, был объединен с 2% сорбитом и другими добавками. Составы смешивали на открытом воздухе и хранили в течение 2 дней при 21°C. Через 2 дня составы высевали на чашки и оценивали на колониеобразующие единицы (КОЕ).

На основе информации, полученной из предыдущего примера, в следующей таблице использовались сорбаты, чтобы понять, возможна ли замена БИТ. Ингредиенты, используемые в составах, описанных в таблице ниже, следующие: сорбит (Neosorb 70/20 B; Roquette; кат. № 421112980; 1347 Beaver Channel Parkway Clinton, IA 52732-5933 USA); бензоат натрия (Alfa Aesar; кат. № A15946; 2 Radcliff Rd, Tewksbury, MA 01876 USA); сорбат калия (Alfa Aesar; кат. № A12844); цитрат натрия (Fisher Scientific; кат. № BP327-500).

В приведенной ниже таблице представлены сводные данные о различных составах и их влиянии на колониеобразующие единицы (КОЕ).

Таблица 10. Консерванты и микробная контаминация. Оцениваемым TVP был TVP-R9Q/T43A. «Na» означает натрий. «K» означает калий в количестве 0,2% масс./масс.

Температура (°C)	**Состав**	**КОЕ**	**pH**
4	2% TVP+2% сорбита+0,03% БИТ	0	н/д
4	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K	0	н/д
4	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д
4	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д
21	2% TVP+2% сорбита+0,03% БИТ	0	5,12
21	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K	0	5,2
21	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	5	5,22

Температура (°C)	Состав	КОЕ	pH
21	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	5,3
37	2% TVP+2% сорбита+0,03% БИТ	0	н/д
37	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K	0	н/д
37	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д
37	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д
45	2% TVP+2% сорбита+0,03% БИТ	0	н/д
45	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K	0	н/д
45	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д
45	2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата Na+сорбата K+ 0,2% ЭДТА	0	н/д

Как показано выше, только состав, состоящий из 2% TVP+2% сорбита+0,2% бензоата натрия+сорбата K+0,2% ЭДТА, при 21°C приводил к каким-либо КОЕ; соответственно, за этим исключением, вышеуказанные составы предотвращают рост микроорганизмов.

Пример 15: Панель стабильности, часть I

В свете результатов, показанных в примере 10, касающихся стабильности TVP в жидком концентрате и формах SDP, была продолжена работа по определению составов, которые стабилизируют TVP. Оцененные составы приведены в таблице ниже. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. концентрата отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); мальтодекстрин (MALTRIN®; Grain Processing Corporation, кат. № M100; 1600 Oregon Street Muscatine, Iowa 52761-1494, USA); трегалоза; мальтоза; K_2HPO_4 (безводный дикалийфосфат; ICL Food Specialties; CAS № 7758-11-4; 622 Emerson Road, Suite 500, St. Louis, MO 63141 USA); KH_2PO_4 (монофосфат калия; ICL Specialty Fertilizers; CAS № 7778-77-0; 2755 W 5th N St N, Summerville, SC 29483) и БИТ (Lonza; PROXEL® AQ Preservative; 9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она; Lonza Group Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland).

Параметры распылительной сушки были следующими: температура на входе: 160°C; температура на выходе: 65-70°C; скорость насоса: 35-40 об/мин; падение давления: 45-50 фунтов на кв. дюйм; аспиратор установлен на 100% и давление распыления 50 фунтов на кв. дюйм.

Образцы оценивали при T0 (время сразу после приготовления и сушки распылительной сушилкой при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе.

Таблица 11. Стабильность составов, часть I. В этой таблице показаны составы, используемые для стабилизации TVP. В данном случае количества показаны в граммах, если не указано иное. «ЖК» означает жидкий концентрат и представляет собой концентрат отделенного от клеток ферментированного пива, экспрессирующих TVP-R9Q/T43A. «Теор. конц.» означает теоретическую концентрацию. «T0 влажн.» означает нулевое время (T0) процент влажности. «-» означает, что данный ингредиент отсутствует.

№ состава	Разведение	H_2O	ЖК (мл)	Мальтодекстрин	Трегалоза	Мальтоза	K_2HPO_4	KH_2PO_4	БИТ (%)	pH	Теор. конц. (%)	Т0 влажн. (%)
1	2x	200,0	100,0	108,9	-	-	0,0	0,0	0,014	5,2	3,74	10,00
2	2x	200,0	100,0	81,7	27,2	-	0,0	0,0	0,014	5,2	3,74	9,60
3	2x	200,0	100,0	81,7	-	27,2	0,0	0,0	0,014	5,2	3,74	8,00
4	2x	200,0	100,0	71,9	35,9	-	0,0	0,0	0,014	5,2	3,77	8,00
5	2x	200,0	100,0	81,7	27,2	-	2,15	1,04	0,014	7,2	3,74	8,00
6	2x	200,0	100,0	71,9	35,9	-	2,15	1,04	0,014	7,8	3,77	8,00
7	2x	200,0	100,0	51,7	17,22	-	2,15	1,04	0,000	7,2	5,38	8,00
8	2x	200,0	100,0	51,7	-	17,22	2,15	1,04	0,000	5,2	5,38	8,00
9	4x	150,0	50,0	45,5	22,7	-	0,00	0,00	0,000	5,2	2,06	10,00
10	4x	150,0	50,0	45,5	22,7	-	2,15	1,04	0,000	7,2	2,06	8,00
11	4x	150,0	50,0	0,0	68,2	-	7,20	1,00	0,000	7,2	2,06	10,00
12	4x	150,0	50,0	0,0	68,2	-	17,00	1,04	0,000	7,8	2,06	7,80
13	4x	150,0	50,0	0,0	68,2	0,0	17,00	1,00	0,000	7,8	2,06	10,00
14	8x	175,0	25,0	50,0	0	0,0	0,25	0,13	0,000	7,2	1,45	10,00
15	2x	100,0	100,0	50,0	0	0,0	0,50	0,25	0,000	7,2	4,84	10,00
16	1x	0,0	200,0	50,0	0	0,0	1,00	0,50	0,000	7,2	7,93	10,00
17	1x	0,0	200,0	50,0	0	0,0	1,00	0,50	0,000	7,2	7,93	7,80

Составы, представленные в таблице выше, оценивали при T0 (время сразу после приготовления, высушивания распылительной сушилкой и при комнатной температуре) и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе. Результаты анализа показаны на **ФИГ. 22.**

Как показано на **ФИГ. 22**, в составах, содержащих мальтозу или мальтодекстрин, наблюдалось значительная деградация. Однако было показано, что комбинации трегалозы и фосфата стабилизируют TVP-R9Q/T43A. В данном случае ни мальтодекстрин, ни мальтоза по отдельности (составы № 1, 3, 15-17) не обеспечивают стабильность; однако использование трегалозы и фосфатов показало улучшенную стабильность (составы № 11-13). **ФИГ. 22**.

Пример 16: Панель стабильности, часть II

Был проведен дополнительный набор тестов для определения следующего: (1) влияет ли трегалоза от разных производителей на стабильность; (2) количество пептида, которое можно стабилизировать заданным количеством трегалозы; (3) необходим ли KH_2PO_4 для стабилизации и (4) предотвратит ли лигносульфонат проблемы с физической стабильностью; и (5) влияние БИТ.

В этом примере каждый состав был создан в соответствии с описаниями, представленными в таблице ниже; в данном случае компоненты объединяли, тщательно перемешивали и/или растворяли, затем сушили распылением. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. концентрата отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); мальтодекстрин (MALTRIN®; Grain Processing Corporation, кат. № M100; 1600 Oregon Street Muscatine, Iowa 52761-1494, USA); трегалоза; мальтоза; K_2HPO_4 (безводный дикалийфосфат; ICL Food Specialties; CAS № 7758-11-4; 622 Emerson Road, Suite 500, St. Louis, MO 63141 USA); KH_2PO_4 (монофосфат калия; ICL Specialty Fertilizers; CAS № 7778-77-0; 2755 W 5th N St N, Summerville, SC 29483) и БИТ (Lonza; PROXEL® AQ Preservative; 9,25% водный раствор 1,2-бензизотиазолин-3-она; Lonza Group Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland); и лигносульфонат (Borregaard LignoTech; Vanisperse CB; CAS № 8061-51-6; Borregaard AS, P.O BOX 162, NO-1701 Sarpsborg, Norway).

Протестированными производителями трегалозы были Bulk Supplements (B) (кат. № TREH100; 7511 Eastgate Rd, Henderson, NV 89011 USA) и Swanson® (S) (кат. № 478; P.O. Box 2803. Fargo, ND 58108-2803 USA).

Параметры распылительной сушки следующие: температура на входе: 160°C; температура на выходе: 65-70°C; скорость насоса: 35-40 об/мин; падение давления: 45-50 фунтов на кв. дюйм; аспиратор установлен на 100% и давление распыления 50 фунтов на кв. дюйм.

Образцы оценивали при T0 и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе.

Таблица 12. Стабильность составов, часть II . В этой таблице показаны составы, использованные для оценки: (1) влияния трегалозы от разных производителей на стабильность; (2) количества пептида, которое можно стабилизировать заданным количеством трегалозы; и (3) необходим ли KH_2PO_4 для стабилизации. Количества показаны в граммах, если не указано иное. «ЖК» означает жидкий концентрат и представляет собой концентрат отделенного от клеток ферментированного пива, экспрессирующих TVP-R9Q/T43A. «Производ.» означает производителя и относится к производителю трегалозы: B=Bulk Supplements; S=Swanson. «Теор. пептид» означает теоретическое процентное содержание пептида. Количество БИТ составляло 0,03% масс./масс., и его присутствие или отсутствие в составе обозначали знаком «+» или «-», соответственно.

№ состава	H_2O	ЖК (мл)	Трегалоза	Производ.	K_2HPO_4	KH_2PO_4	Лигносульфонат	БИТ	pH	Теор. % пептида
18	150,0	50,0	68,2	S	7,20	1,00	0,00	-	7,2	1,88
19	150,0	50,0	68,2	B	7,20	1,00	0,0	-	7,2	1,88
20	100,0	100,0	68,2	S	7,20	1,00	0,00	-	7,2	3,46
21	100,0	100,0	68,2	B	7,20	1,00	0,0	-	7,2	3,46
22	50,0	150,0	68,2	B	7,20	1,00	0,00	-	7,2	4,82
23	25,0	175,0	68,2	B	17,00	1,00	0,0	-	7,8	4,94
24	150,0	50,0	68,2	B	0,00	0,00	0,00	-	5,2	2,06
25	100,0	100,0	68,2	B	7,20	1,00	0,00	+	7,2	5,02
26	100,0	100,0	68,2	S	7,20	1,00	0,00	+	7,2	5,02
27	100	100	68,2	B	7,20	1,00	0,00	+	7,2	5,02
28	100,0	100,0	68,2	B	0,00	0,00	5,00	+	5,2	5,42

Трегалоза, полученная от разных производителей, не влияла на стабильность TVP-R9Q/T43A (см., например, составы № 20, 21, 26, 27). **ФИГ. 23**.

Количество пептида, которое можно было стабилизировать, было увеличено с 2% (см. составы в предыдущем примере) до примерно 5% (см. составы № 25-28). **ФИГ. 23**.

В данном случае вопрос о том, был ли KH_2PO_4 необходим для стабилизации, был неубедительным. Последняя строка в приведенной выше таблице показывает единственный состав, содержащий лигносульфонат (состав № 28). Лигносульфонат был добавлен из-за неожиданно возникшей проблемы с физической стабильностью: во время хранения при 54°C составы № 18-27 имели физическую форму, которая изменялась от легкого порошка до ломкой твердой агломерации. **На ФИГ. 24**.

Лигносульфонат добавляли к составу № 28 для предотвращения этой агломерации, тем самым сохраняя составы в виде сухого сыпучего порошка. Хотя добавление лигносульфоната предотвращало образование ломкого твердого вещества, тем не менее оно не предотвращало комкование. **На ФИГ. 25**.

Наконец, как показано в составах № 8-11, добавление БИТ не влияло на стабильность TVP-R9Q/T43A.

В некоторых образцах было обнаружено явное увеличение содержания пептида; этот результат, вероятно, является артефактом, возникшим в результате неожиданных проблем с физической стабильностью. **ФИГ. 23**. Как упоминалось выше, хранение при 54°C приводило к изменению физической формы из легкого порошка в ломкие твердые агломераты. Следовательно, агломерация порошка затрудняла точные измерения, а видимое увеличение содержания пептида (например, в составе № 22) можно отнести к проблемам с получением репрезентативного образца.

Пример 17: Панель стабильности, часть III

На основании информации, полученной из примеров 15 и 16, были проведены дополнительные эксперименты с распылительной сушкой: в данном случае цель состояла в том, чтобы стабилизировать пептид при одновременном сохранении физической стабильности (т.е. в форме сухого сыпучего порошка).

Составы готовили с использованием ингредиентов в соответствии с приведенной ниже таблицей и оценивали с помощью ВЭЖХ, как описано в настоящем документе. Компоненты объединяли, тщательно перемешивали и/или растворяли, а затем сушили распылением. Тестируемые ингредиенты включают следующее: TVP-R9Q/T43A в форме жидкого концентрата (ЖК), т.е. концентрата отделенного от клеток ферментированного пива; H_2O (обратный осмос); трегалоза; лигносульфат (Borregaard LignoTech; Vanisperse CB; CAS № 8061-51-6; Borregaard AS, P.O BOX 162, NO-1701 Sarpsborg, Norway); мальтодекстрин (MALTRIN®; Grain Processing Corporation, кат. № M100; 1600 Oregon Street Muscatine, Iowa 52761-1494, USA); K_2HPO_4 (безводный дикалийфосфат; ICL Food Specialties; CAS № 7758-11-4; 622 Emerson Road, Suite 500, St. Louis, MO 63141 USA); KH_2PO_4 (монофосфат калия; ICL Specialty Fertilizers; CAS № 7778-77-0; 2755 W 5th N St N, Summerville, SC 29483) и БИТ (Lonza; PROXEL® AQ Preservative; 9,25% водный раствор

1,2-бензизотиазолин-3-она; Lonza Group Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland). Протестированными производителями трегалозы были Swanson® (S) (кат. № 478; P.O. Box 2803. Fargo, ND 58108-2803 USA) и Nagase America LLC. (N) (TREHA®; невосстанавливающий дисахарид, состоящий из двух молекул глюкозы, связанных α,α-1,1-связью; 546 5th Avenue, Floor 19, New York, NY 10036-5000 USA).

Параметры распылительной сушки следующие: температура на входе: 160°C; температура на выходе: 65-70°C; скорость насоса: 35-40 об/мин; падение давления: 45-50 фунтов на кв. дюйм; аспиратор установлен на 100% и давление распыления 50 фунтов на кв. дюйм.

Образцы оценивали при T0 и после инкубации в течение двух недель при 54°C. Концентрацию пептида определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ, как описано в данном документе.

Уравнение для расчета теоретической концентрации пептида выглядит следующим образом:

$$\text{Концентрация пептида (\% масс./масс.)} = \frac{\text{Масса пептида (г)}}{\text{Масса сухих веществ (г)}} \times 100$$

Формула (IV)

Таблица 13. Стабильность составов, часть III. В этой таблице показаны составы, используемые для оценки влияния составов на стабилизацию пептидов и физическую стабильность. Количества показаны в граммах, если не указано иное. «ЖК» означает жидкий концентрат и представляет собой концентрат отделенного от клеток ферментированного пива, экспрессирующих TVP-R9Q/T43A. «Производ.» означает производителя и относится к производителю трегалозы: S=Swanson; N=Nagase. «M100» относится к мальтодекстрину. «Теор. пептид» означает теоретическое процентное содержание пептида.

№ состава	H_2O	ЖК (мл)	Трегалоза	Производ.	Лигносульфонат	M100	K_2HPO_4	KH_2PO_4	БИТ	pH	Теор. % пептида
29	150,0	50,0	68,2	S	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	2,8
30	150,0	50,0	68,2	N	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	2,8
31	100,0	100,0	68,2	N	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	5,0
32	50,0	200,0	68,2	N	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	8,1
33	0,0	300,0	68,2	N	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	10,3
34	0,0	200,0	34,1	N	0,0	0,0	3,60	0,50	+	7,2	11,8
35	155,0	145,0	68,2	N	0,0	34,1	7,20	1,00	+	7,2	5,0
36	110,0	190,0	68,2	N	0,0	68,2	7,20	1,00	+	7,2	5,0
37	110,0	115,0	68,2	N	10,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	5,0
38	110	127	68,2	N	20,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	5,0
39	0,0	200,0	0	N	0,0	0,0	7,20	1,00	+	7,2	18,6
40	150	50	68,2	S	0,0	0,0	7,20	1,00	-	7,2	1,9

Как показано на **ФИГ. 26**, гистограмма показывает теоретическую концентрацию пептида на основе состава композиции, описанного в таблице выше (черный столбец). Фактическое процентное содержание пептида при T0 показано серым столбцом. Фактическое процентное содержание пептида после двухнедельной инкубации при 54°C показано заштрихованным столбцом. **На ФИГ. 26.**

В данном случае добавление лигносульфоната не предотвратило физическую нестабильность. Однако составы в этом примере были способны стабилизировать пептид, а также поддерживать физическую стабильность в форме сухого сыпучего порошка. Составы № 35 и № 36 показали хорошую стабильность пептидов и привели к формированию сухого сыпучего порошка. **ФИГ. 27-28.**

Составы № 31-34 продемонстрировали хорошую стабильность пептидов, однако они, тем не менее, приводили к образованию комков и/или агломерации.

Пример 18: Сухие и гранулированные составы

Разработка сухого состава

Четыре состава-прототипа были созданы в экспериментальном масштабе с использованием сушилок с псевдоожиженным слоем с целью создания гранулированного продукта, придающего стабильность нестабильному активному ингредиенту TVP.

Составы-прототипы были созданы с добавлением различных количеств трегалозы к жидкому концентрату (ЖК), содержащему TVP-R9Q/T43A, перед сушкой.

Схема испытания показана в таблице ниже. Все ингредиенты, кроме мальтодекстрина, добавляли перед процессом сушки в псевдоожиженном слое. Во время процесса сушки в псевдоожиженном слое приготовленную жидкость распыляли на псевдоожиженный слой мальтодекстрина для создания гранул. Используемые ингредиенты такие же, как те, что описаны в примерах выше.

Таблица 14. Составы-прототипы. «ЖК» означает жидкий концентрат. «ЖК РТ» означает жидкий концентрат растворенных твердых веществ.

№ испытания	**ЖК пептида (г/л)**	**ЖК РТ (г/кг)**	**ЖК (мл)**	**Трегалоза (г)**	**Мальтодекстрин (г)**	**K_2HPO_4 (г)**	**KH_2PO_4 (г)**
1	58	226	4000	697,2	1000	73,4	9,96
2	58	226	1000	300	100	29	4
3	58	226	1000	200	100	29	4
4	58	226	1000	100	100	29	4

Теоретический конечный % масс./масс. для прототипов после процесса сушки в псевдоожиженном слое представлен в таблице ниже. Считается, что процент активного ингредиента TVP-R9Q/T43A (% АИ) содержится в жидком концентрате растворенного твердого вещества (% ЖК РТ).

Таблица 15. Теоретический конечный % масс./масс. для составов-прототипов. «% АИ» относится к процентному содержанию активного ингредиента (TVP-R9Q/T43A).

«ЖК РТ» означает жидкий концентрат растворенных твердых веществ. Количества указаны в % масс./масс.

№ испытания	% АИ	% ЖК РТ	% трегалозы	% мальтодекстрина	% K_2HPO_4	% KH_2PO_4	% БИТ
1	8,42	35,37	25,29	36,27	2,66	0,36	0,05
2	8,57	36,00	44,31	14,77	4,28	0,59	0,05
3	10,05	42,24	34,66	17,33	5,03	0,69	0,06
4	12,16	51,09	20,96	20,96	6,08	0,84	0,07

Теоретические составы (средние значения) четырех прототипов представлены на **ФИГ. 29**, на основании данных, представленных в таблице ниже.

Таблица 16. Данные теоретического состава. «R» означает повторение и относится к повторению анализа для измерения пептидов (т. е. не к техническим повторам). «Средн.» значит средний. T0 означает нулевое время. T2w означает время в две недели. Станд. откл. означает стандартное отклонение.

№ испытания	T0 TVP (% масс/масс.)	Средн. T0 (% масс/масс.)	Станд. откл.	T2w TVP (% масс/масс.)	Средн. T2w (% масс/масс.)	Станд. откл. образцов T2w	Ожидаем. TVP % масс/масс. При T0
Испытание №1 R1	7,99	8,22	0,23	8,24	8,15	0,06	8,64%
Испытание №1 R2	8,13			8,10			
Испытание №1 R3	8,53			8,12			
Испытание №2 R1	7,92	7,85	0,09	8,43	8,39	0,04	8,80%
Испытание №2 R2	7,72			8,39			
Испытание №2 R3	7,92			8,33			
Испытание	9,94	9,52	0,30	9,80	9,62	0,15	10,32%

№3 R1							
Испытание №3 R2	9,38			9,44			
Испытание №3 R3	9,24			9,61			
Испытание №4 R1	10,85			11,05			
Испытание №4 R2	11,31	11,01	0,22	10,93	10,99	0,05	12,64%
Испытание №4 R3	10,86			10,99			

Четыре прототипа оценивали на устойчивость к высоким температурам посредством инкубации при 54°C в течение двух недель в присутствии пакета поглотителя кислорода/влаги (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., продукт № AS-100; 655 3rd Ave # 24, New York, NY 10017 USA). Измерение пептида TVP-R9Q/T43A проводили с использованием ВЭЖХ-УФ при t=0 (после приготовления состава и сушки) и t=14 дней.

Как показано на **ФИГ. 30**, все четыре прототипа были стабильны после инкубации в течение двух недель при 54°C.

Последующий процесс приготовления состава был разработан на основе предшествующей серии экспериментов. В процессе приготовления состава измеряют жидкий концентрат растворенного твердого вещества (ЖК РТ) в процессе ферментации, т. е. в последующем процессе, и добавляют трегалозу в соответствующем соотношении для придания стабильности нестабильному пептиду TVP-R9Q/T43A после сушки.

Проверенные диапазоны тестируемых соотношений составляли от около 0,81 до около 2,44 ЖК РТ на трегалозу (0,81-2,44 ЖК РТ:трегалоза) и представлены в таблице ниже.

Таблица 17. Диапазоны соотношения TVP к трегалозе. «ЖК РТ» означает жидкий концентрат растворенных твердых веществ. Матричные РТ относится к растворенным твердым веществам, оставшимся после стадий ферментации/последующей обработки перед приготовлением состава.

№ испытания	**Трегалоза (г)**	**Расчетное значение ЖК РТ (г)**	**Матричные РТ: Трегалоза**
1	697	975	1,40
2	300	244	0,81
3	200	244	1,22

4	100	244	2,44

Предшествующие испытания также были физически стабильными, поскольку они были в сухой сыпучей гранулированной форме. Результаты физической формы испытаний № 1, 2, 3 и 4 показаны на **ФИГ. 31-34.**

Пример 19: Анализ кругового дихроизма (КД) стабилизации трегалозы

Круговой дихроизм (КД) - это метод абсорбционной спектроскопии. КД использует дифференциальное поглощение света с левой и правой круговой поляризацией. Спектр, полученный благодаря этому явлению, называется спектром КД, в котором сигнал КД представлен в миллиградусах (мград).

Оптически активная хиральная молекула будет предпочтительно поглощать свет с круговой поляризацией в одном направлении; и разницу в этом поглощении, т. е. света с левой или правой круговой поляризацией, можно измерить и количественно оценить. Ультрафиолетовый (УФ) КД можно использовать для определения аспектов вторичной структуры белка, например, альфа-спирали, бета-листа, случайной спирали и т. д. Например, одним из наиболее широко используемых применений КД является оценка того, правильно ли уложен белок и/или влияет ли данная мутация на стабильность или конформацию этого белка. *См.* N. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, Nat Protoc. 2006; 1(6): 2876-2890.

Для дальнейшей оценки влияния трегалозы на стабилизацию TVP и их биофизических характеристик композицию, содержащую компоненты с минимальной и высокой степенью чистоты, исследовали с использованием КД. В данном случае композиция содержала 10% трегалозы и 0,5 ppt (0,05% масс./об.) TVP-R9Q/T43A. Помимо трегалозы и Ta1b, единственным другим компонентом является 10 мМ натрий-фосфатный буфер. Спектры КД регистрировали на спектрометре Jasco J-1500 (JASCO Inc., 28600 Mary's Court, Easton, MD 21601 USA). TVP-R9Q/T43A разбавляли 10 мМ фосфатом натрия, pH 7,0, в концентрации 0,5 мг/мл в кварцевой кювете диаметром 0,1 см. Спектры записывали с интервалами 0,1 нм при скорости сканирования 100 нм/мин$^{-1}$ при 20°C. Кривые плавления с фиксированной длиной волны были построены для каждого 1°C с изменением температуры 10°C мин$^{-1}$. Кривые плавления аппроксимировали сигмоидой Больцмана для определения температуры плавления (T_m).

Добавление 10% трегалозы стабилизирует вторичную структуру TVP-R9Q/T43A, на что указывают углубляющиеся спектры КД при 214 нм и 220 нм, которые показывают, что пептид стал более альфа-спиральным, что соответствует его трехмерной структуре. **На ФИГ. 35**. Кроме того, добавление 10% трегалозы повышает температуру плавления TVP-R9Q/T43A с 71,6°C до 73,6°C, поддерживая его повышенную стабильность в присутствии трегалозы. **На ФИГ. 36**.

Пример 20: Краткое описание стабильного состава

В таблице ниже приводится краткое описание компонентов, используемых для создания стабильного состава TVP.

Таблица 18. Иллюстративный состав. Количества в % масс./масс., описанные

ниже, представляют собой краткое изложение иллюстративного состава, основанного на результатах, полученных в разделе «Примеры».

Компонент	**% масс./масс.**
TVP	8,50%
1,2-бензизотиазолин-3-он	0,05%
Мальтодекстрин (M100)	36,30%
Трегалоза	25,30%
Безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4)	2,60%
Одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4)	0,40%
Твердые вещества ферментации	26,85%

Пример 21: Сканирование положения и анализ кишечной среды

TVP подвергали воздействию протеаз кишечника чешуекрылых, чтобы определить их стабильность в среде, моделирующей кишечник чешуекрылых.

Получение вектора экспрессии TVP

ДНК-конструкцию различных TVP оптимизировали по кодонам и синтезировали в виде слитой с пре-/про-последовательностью альфа-фактора спаривания Kluyveromyces lactis (αMF) и лигировали в сайты рестрикции NotI и HindIII pKlac1 (New England Biolabs®). Вектор расщепляли SacII для линеаризации и удаления бактериального Ori и маркера селекции, затем электропорировали в электрокомпетентные клетки Kluyveromyces lactis. Трансформанты с множественными копиями гена отбирали на чашках для селекции, содержащих ацетамид в качестве единственного источника азота. Клоны, экспрессирующие TVP, оценивали с помощью ВЭЖХ на колонке Chromolith C18 (4,6×25 мм) и элюировали при скорости потока 2 мл $мин^{-1}$ и градиенте 10-30% ацетонитрила в течение 2 мин.

Расщепление TVP

Для определения стабильности TVP при воздействии протеаз кишечника чешуекрылых личинок Helicoverpa zea пятого возраста препарировали для отделения интактного пищеварительного тракта от других тканей и гемолимфы. Для получения кишечного экстракта Helicoverpa (HGE, англ.: Helicoverpa gut extract) в слизистой оболочке кишечника делали небольшой надрез, чтобы содержимое кишечника можно было собрать в пробирку. Множественные срезы объединяли и хранили на льду для немедленного использования, или хранили при температуре -80°C для использования в будущем.

Ta1b дикого типа (SEQ ID NO: 1) использовали в качестве матрицы и мутировали аминокислотной заменой в положении 9 (т.е. R9; SEQ ID NO: 1) для получения оцениваемых в данном документе TVP; эти TVP имеют замену аргинина в положении 9 (т.е. R9) аминокислотной последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1) на одну из аминокислот F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, D, V, M, I, Q, C, E, T и S; кроме того, аналогичным образом оценивали TVP с мутацией R9Q+T43A (относительно Ta1b дикого

типа) (SEQ ID NO: 85). Каждая протестированная в данном документе TVP и ее аминокислотная замена (замены) показаны в Таблице 19.

TVP, описанные выше и показанные в Таблице 19, подвергали воздействию кишечного экстракта Helicoverpa (HGE) для имитации расщепления в кишечной среде чешуекрылых. В данном примере TVP инкубировали с 6-кратно разбавленным количеством HGE, полученным из клеток Helicoverpa, выращенных в глубоких лунках. В 6-кратно разведенный HGE добавляли 30 мМ Трис-HCl, pH 8,8, для поддержания щелочного pH кишечной среды Helicoverpa.

Образцы расщепленных TVP собирали в моменты времени 0, 3 и 22,5 часа. Чтобы остановить процесс расщепления, к образцам добавляли 30 мМ глицина, pH 2,0, и образцы расщепленных TVP немедленно анализировали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой для количественного определения площади пика TVP. Как показано в Таблице 19, когда Ta1b ДТ инкубируют с 6-кратно разведенным HGE, он полностью расщепляется между 3 и 22,5 часами с периодом полужизни 1,9 часа.

Как показано в Таблице 19 ниже, замена R9 аминокислотами A, G, N, L, D, V, M, I, Q+T43A, Q, C, E, T или S (как показано в SEQ ID NO : 77-90), полностью отменила расщепление HGE. Напротив, замена R9 аминокислотами F, P, Y, K, W или H (как показано в SEQ ID NO: 71-76) не обеспечивала существенного увеличения стабильности по сравнению со стабильностью, наблюдаемой в Ta1b дикого типа.

Таблица 19. Полный анализ расщепления с помощью сканирования основных аминокислот.

Аминокислота (позиция 9)	**Период полужизни (часы)**	**SEQ ID NO.**	**Последовательность**	**Результат**
R (ДТ)	1,9	1	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	нет данных
F	2,0	71	EPDEICRAFMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	Нестабильный
P	2,1	72	EPDEICRAPMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
Y	4,4	73	EPDEICRAYMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
K	6,3	74	EPDEICRAKMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
W	9,1	75	EPDEICRAWMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	

H	9,6	76	EPDEICRAHMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
A	10,7	77	EPDEICRAAMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	Стабильный
G	12,7	78	EPDEICRAGMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
N	13,8	79	EPDEICRANMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
L	17,5	80	EPDEICRALMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
D	22,6	81	EPDEICRADMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
V	23,6	82	EPDEICRAVMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
M	26,4	83	EPDEICRAMMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
I	31,8	84	EPDEICRAIMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
Q+T43A	36,8	85	EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYAACHEAQKG	
Q	42,2	86	EPDEICRAQMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
C	63,4	87	EPDEICRACMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
E	67,9	88	EPDEICRAEMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
T	95,8	89	EPDEICRATMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	
S	139,4	90	EPDEICRASMTNKEFTYKSNVCNNCGDQV AACEAECFRNDVYTACHEAQKG	

Пример 22: Удаление сайта гликозилирования

Получение вектора экспрессии TVP

ДНК-конструкцию различных TVP оптимизировали по кодонам и синтезировали в виде слитой с пре-/про-последовательностью альфа-фактора спаривания Kluyveromyces lactis (αMF) и лигировали в сайты рестрикции NotI и HindIII pKlac1 (New England Biolabs).

Вектор расщепляли SacII для линеаризации и удаления бактериального Ori и маркера селекции, затем электропорировали в электрокомпетентные клетки Kluyveromyces lactis. Трансформанты с множественными копиями гена отбирали на чашках для селекции, содержащих ацетамид в качестве единственного источника азота. Клоны, экспрессирующие TVP, оценивали с помощью ВЭЖХ на колонке Chromolith C18 (4,6×25 мм) и элюировали при скорости потока 2 мл мин-1 и градиенте 10-30% ацетонитрила в течение 2 мин. TVP оценивали на гликозилирование (от +162 до молекулярной массы) с помощью ЖХ-МС на колонке Chromolith C18 (4,6×100 мм), элюировали при скорости потока 1 мл $мин^{-1}$ и анализировали с помощью масс-спектрометрии, как описано в приведенных выше примерах.

Как показано в Таблице 20, из аминокислот, замещенных в положении 43, только треонин (T) и серин (S) (SEQ ID NO: 108 и 109) давали гликозилированные соединения, в то время как другие 18 различных аминокислот (SEQ ID NO: 91-107 и 110) не давали никаких гликозилированных соединений.

Таблица 20. Результаты удаления сайта гликозилирования.

Аминокислота (позиция 43)	**Гликозилирование (да/нет)**	**SEQ ID NO.**	**Последовательность**
F	Нет	91	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYFACHEAQKG
P	Нет	92	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYPACHEAQKG
Y	Нет	93	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYYACHEAQKG
K	Нет	94	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYKACHEAQKG
W	Нет	95	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYWACHEAQKG
H	Нет	96	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYHACHEAQKG
A	Нет	97	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYAACHEAQKG
G	Нет	98	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYGACHEAQKG
N	Нет	99	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ

			VAACEAECFRNDVYNACHEAQKG
L	Нет	100	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYLACHEAQKG
D	не испытано	101	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYDACHEAQKG
V	Нет	102	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYVACHEAQKG
M	Нет	103	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYMACHEAQKG
I	Нет	104	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYIACHEAQKG
Q	Нет	105	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYQACHEAQKG
C	Нет	106	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYCACHEAQKG
E	Нет	107	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYEACHEAQKG
T (ДТ)	**Да**	108	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYTACHEAQKG
S	**Да**	109	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYSACHEAQKG
R	Нет	110	EPDEICRARMTNKEFTYKSNVCNNCGDQ VAACEAECFRNDVYRACHEAQKG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемая соль.

4. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемая соль.

5. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемая соль.

6. TVP по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110, или его фармацевтически приемлемая соль.

7. TVP по п. 6, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

8. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

9. TVP по п. 1, отличающийся тем, что TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

10. TVP по п. 9, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

11. TVP по п. 10, отличающийся тем, что расщепляемый линкер расщепляется

внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

12. TVP по п. 11, отличающийся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

13. TVP по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

14. Композиция, состоящая из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемая соль.

17. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемая соль.

18. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемая соль.

19. Композиция по любому из пп. 14-18, отличающаяся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

20. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

21. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

22. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

23. TVP по п. 22, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

24. TVP по п. 23, отличающийся тем, что расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

25. TVP по п. 24, отличающийся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

26. Композиция по любому из пп. 14-25, отличающаяся тем, что если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

27. Композиция по любому из пп. 14-26, отличающаяся тем, что один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

28. Композиция по п. 27, отличающаяся тем, что TVP находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

29. Композиция по п. 28, отличающаяся тем, что TVP находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

30. Композиция по п. 29, отличающаяся тем, что TVP составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

31. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что композиция по сути состоит из

следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

32. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что композиция состоит из следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

33. Композиция, состоящая из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

34. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5, или его фармацевтически приемлемая соль.

35. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин, или его фармацевтически приемлемая соль.

36. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную

замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует, или его фармацевтически приемлемая соль.

37. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют, или его фармацевтически приемлемая соль.

38. Композиция по любому из пп. 33-37, отличающаяся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

39. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

40. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

41. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

42. Композиция по п. 41, отличающаяся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

43. Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

44. Композиция по п. 43, отличающаяся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

45. Композиция по любому из пп. 33-44, отличающаяся тем, что если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

46. Полинуклеотид, кодирующий TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом TVP содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарная ему нуклеотидная последовательность.

47. Полинуклеотид по п. 46, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

48. Полинуклеотид по п. 46, отличающийся тем, что TVP имеет одну

аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

49. Полинуклеотид по п. 46, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

50. Полинуклеотид по п. 46, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

51. Полинуклеотид по любому из пп. 46-50, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

52. Полинуклеотид по любому из пп. 46-51, отличающийся тем, что полинуклеотидная последовательность имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

53. Полинуклеотид по любому из пп. 46-53, отличающийся тем, что если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

54. Способ получения TVP, включающий:

(a) получение вектора, содержащего первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, или комплементарную ему нуклеотидную последовательность, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7, при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует.

(b) введение вектора в клетку-хозяина; и

(c) выращивание клетки-хозяина в питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию TVP и секрецию в питательную среду.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

56. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

57. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

58. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную

замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

59. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что вектор представляет собой плазмиду, содержащую сигнал альфа-MF.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что сигнал альфа-MF способен экспрессировать сигнальный пептид альфа-MF.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что вектор трансформируют в клетку-хозяина.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что клетка-хозяин является эукариотической клеткой или прокариотической клеткой.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что эукариотическая клетка представляет собой дрожжевую клетку.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что дрожжевая клетка выбрана из любых видов, принадлежащих к родам: Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces.

67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что дрожжевая клетка выбрана из группы, состоящей из Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что дрожжевая клетка представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что дрожжевая клетка представляет собой Kluyveromyces lactis.

70. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP секретируется в питательную среду.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что TVP функционально связан с сигнальным пептидом альфа-MF.

72. Способ по п. 54, отличающийся тем, что экспрессия TVP обеспечивает выход: по меньшей мере 70 мг/л, по меньшей мере 80 мг/л, по меньшей мере 90 мг/л, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 110 мг/л, по меньшей мере 120 мг/л, по меньшей мере 130 мг/л, по меньшей мере 140 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 160 мг/л, по меньшей мере 170 мг/л, по меньшей мере 180 мг/л, по меньшей мере 190, по меньшей мере мг/л 200 мг/л, по меньшей мере 500 мг/л, по меньшей мере 750 мг/л, по меньшей мере 1000 мг/л, по меньшей мере 1250 мг/л, по меньшей мере 1500 мг/л, по меньшей мере 1750 мг/л, по меньшей мере 2000 мг/л, по меньшей мере 2500 мг/л, по меньшей мере 3000 мг/л, по меньшей мере 3500 мг/л, по меньшей мере 4000 мг/л, по меньшей мере 4500 мг/л,

по меньшей мере 5000 мг/л, по меньшей мере 5500 мг/л, по меньшей мере 6000 мг/л, по меньшей мере 6500 мг/л, по меньшей мере 7000 мг/л, по меньшей мере 7500 мг/л, по меньшей мере 8000 мг/л, по меньшей мере 8500 мг/л, по меньшей мере 9000 мг/л, по меньшей мере 9500 мг/л, по меньшей мере 10000 мг/л, по меньшей мере 11000 мг/л, по меньшей мере 12000 мг/л, по меньшей мере 12500 мг/л, по меньшей мере 13000 мг/л, по меньшей мере 14000 мг/л, по меньшей мере 15000 мг/л, по меньшей мере 16000 мг/л, по меньшей мере 17000 мг/л, по меньшей мере 17500 мг/л, по меньшей мере 18000 мг/л, по меньшей мере 19000 мг/л, по меньшей мере 20000 мг/л, по меньшей мере 25000 мг/л, по меньшей мере 30000 мг/л, по меньшей мере 40000 мг/л, по меньшей мере 50000 мг/л, по меньшей мере 60000 мг/л, по меньшей мере 70000 мг/л, по меньшей мере 80000 мг/л, по меньшей мере 90000 мг/л или по меньшей мере 100000 мг/л TVP на литр среды для культивирования дрожжей.

73. Способ по п. 71, отличающийся тем, что экспрессия TVP обеспечивает выход не менее 100 мг/л TVP на литр среды.

74. Способ по п. 54, отличающийся тем, что экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии одного TVP в среде.

75. Способ по п. 54, отличающийся тем, что экспрессия TVP в среде приводит к экспрессии в среде слитого полимера TVP, содержащего два или более полипептидов TVP.

76. Способ по п. 54, отличающийся тем, что вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии.

77. Способ по п. 54, отличающийся тем, что вектор содержит две или три кассеты экспрессии, каждая кассета экспрессии способна кодировать TVP первой кассеты экспрессии или TVP другой кассеты экспрессии.

78. Способ по п. 54, отличающийся тем, что первая кассета экспрессии способна кодировать TVP, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

79. Способ по п. 54, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

80. Способ по любому из пп. 54-79, отличающийся тем, что если Z_1 представляет собой T или S, то TVP является гликозилированным.

81. Способ применения композиции по п. 14 для борьбы с насекомыми, включающий доставку композиции по п. 14 к очагу насекомого.

82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что насекомые выбраны из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia* unipuncta); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe

scribonia); банановогo шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea);

хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

83. Способ защиты растения от насекомых, включающий получение растения, которое экспрессирует TVP или кодирующий его полинуклеотид.

84. Способ по п. 82, отличающийся тем, что указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

86. Способ по п. 84, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

87. Способ по п. 84, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

88. Способ по п. 84, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

89. Способ по любому из пп. 84-88, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

90. Способ по любому из пп. 84-89, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

91. Способ по п. 83, отличающийся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

92. Способ по п. 83, отличающийся тем, что TVP представляет собой слитый белок,

содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

93. Способ по п. 83, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

94. Способ по п. 83, отличающийся тем, что расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

95. Способ по п. 83, отличающийся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

96. Способ по п. 83, отличающийся тем, что насекомые выбраны из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia* unipuncta); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe scribonia); бананового шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли

(Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea); хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

97. Способ по п. 96, отличающийся тем, что насекомые выбраны из группы, состоящей из: Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

98. Способ уничтожения, борьбы или ингибирования вредителя, включающий применение пестицидно эффективного количества композиции по п. 14 к очагу вредителя или к растению или животному, подверженному нападению вредителя.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что вредитель выбран из группы, состоящей из: Achema Sphinx Moth (бражник) (Eumorpha achemon); Alfalfa Caterpillar (Colias eurytheme); сухофруктовой огневки (Caudra cautella); мотылька Аморбия (Amorbia humerosana); сподоптеры (Spodoptera spp., e.g. *мокрица, совка, жук-прыгун, Pseudaletia* unipuncta); артишоковой моли (Platyptilia carduidactyla); гусеницы азалии (Datana major); мешочницы (Thyridopteryx); мешочница поденкоподобная); банановой моли (Hypercompe

scribonia); банановой шкипера (Erionota thrax); черноголовой листовертки (Acleris gloverana); калифорнийского дубового червя (Phryganidia californica); весеннего плодового червя (Paleacrita merriccata); вишневого червя (Grapholita packardi); огневки кувшинковой (Nymphula stagnata); цитрусовой совки (Xylomyges curialis); яблоневой моли (Cydia pomonella); клюквенного червя (Acrobasis vaccinii); крестополосной капустницы (Evergestis rimosalis); совки (виды Noctuid, Agrotis ipsilon); пихтовой моли Дугласа (Orgyia pseudotsugata); элло-мотылька (бражник) (Erinnyis ello); вязовой бабочки (Ennomos subsignaria); гроздевой листовертки (Lobesia botrana); европейского шкипера (Thymelicus lineola (эссексий шкипер); американской белой бабочки (Melissopus latiferreanus; листовертки фундука (Archips rosanus; листовертки фруктового дерева (Archips argyrospilia; виноградной моли (Paralobesia viteana; виноградной листовертки (Platynota stultana; скелетонизатора виноградного листа (Harrisina americana (только личинка); гипены скабры (Plathypena scabra; розовой кленовой бабочки (Dryocampa rubicunda; Gummosos-Batrachedra; Comosae (Hodges); непарного шелкопряда (Lymantria dispar); гусеницы болиголова (Lambdina fiscellaria); бражника (Manduca spp.); белянки репной (Pieris rapae); сатурнии ио (Automeris io); соснового червя (Choristoneura pinus); новозеландской листовертки (Epiphyas postvittana); бахчевой бабочки (Diaphania hyalinata); мимозной белокрылки (Homadaula anisocentra); косополосого листоверта (Choristoneura rosaceana); мотылек олеандра (Syntomeida epilais); всеядной листовертки (Playnota stultana); всеядного петлителя (Sabulodes aegrotata); парусника кресфонтеса (Papilio cresphontes); оранжевый мотылек (Argyrotaenia citrana); Oriental Fruit Moth (Grapholita molesta); фруктовой полосатой моли (Anarsia lineatella); сосновой бабочки (Neophasia menapia); американской кукурузной совки (Heliocoverpa zea); моли с красными полосами (Argyrotaenia velutinana); красногорбой гусеницы (Schizura concinna); комплекса личинок (разные Leps.); седловой гусеницы (Sibine stimulea); оседланной видной моли (Heterocampa guttivitta); моли акреа (Estigmene acrea); огневки-травянки (Crambus spp.); пяденицы (Ennomos subsignaria); осеннего анкера (Alsophila pometaria); еловой листовертки (Choristoneura fumiferana); палаточных гусениц (Various Lasiocampidae); паразитической гусеницы ананасового мотылька (Geyr, Thecla basilides); бражника табачного (Manduca sexta); табачной моли (Ephestia elutella); хохлатого яблоневого мотылька (Platynota idaeusalis); жука-амброзии (Anarsia lineatella); пестрой совки (Peridroma saucia); пестрой листовертки (Platynota flavedana); бархатной гусеницы (Anticarsia gemmatalis); гусеницы грецкого ореха (Datana integerrima); американской белой бабочки (Hyphantria cunea); западной кочковатой моли (Orgyia vetusta); южного кукурузного мотылька (Diatraea crambidoides); кукурузного червя; картофельного долгоносика; перечного долгоносика; цитрусового долгоносика; земляничного долгоносика; пеканового долгоносика; долгоносика фундука; рисового долгоносика; люцернового долгоносика; клеверного долгоносика; чайного бурильщика; корневого долгоносика; жука сахарного тростника; кофейного бурильщика; ежегодного мятлика обыкновенного (Listronotus maculicollis); азиатского садового жука (Maladera castanea);

хруща европейского (Rhizotroqus majalis); зеленого июньского жука (Cotinis nitida); японского жука (Popillia japonica); майского или июньского жука (Phyllophaga sp.); северного майского жука (Cyclocephala borealis); восточного жука (Anomala orientalis); южного майского жука в маске (Cyclocephala lurida); клопа (Curculionoidea); Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что вредитель выбран из группы, состоящей из: Aedes aegypti; Busseola fusca; Chilo suppressalis; Culex pipiens; Culex quinquefasciatus; Diabrotica virgifera; Diatraea saccharalis; Helicoverpa armigera; Helicoverpa zea; Heliothis virescens; Leptinotarsa decemlineata; Ostrinia furnacalis; Ostrinia nubilalis; Pectinophora gossypiella; Plodia interpunctella; Plutella xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera exigua; Spodoptera frugiperda; Spodoptera littoralis; Trichoplusia ni и Xanthogaleruca luteola.

101. Вектор, содержащий полинуклеотид, способный кодировать TVP, имеющий аминокислотную последовательность с 90% сходством с последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

102. Вектор по п. 101, отличающийся тем, что полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

103. Штамм дрожжей, содержащий: первую кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, способный кодировать TVP, при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (I): E-P-D-E-I-C-R-X_1-X_2-M-X_3-N-K-E-F-T-Y-X_4-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-X_5-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-X_6-X_7,
при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой A, S или N; X_2 представляет собой R, Q, N, A, G, N, L, D, V, M, I, C, E, T или S; X_3 представляет собой T или P; X_4 представляет собой K или A; X_5 представляет собой R или A; Z_1 представляет собой T, S, A, F, P, Y, K, W, H, A, G, N, L, V, M, I, Q, C, E или R; X_6 представляет собой K или отсутствует; и X_7 представляет собой G или отсутствует; или комплементарную ему нуклеотидную последовательность.

104. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5.

105. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 представляет собой глицин.

106. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_7 отсутствует.

107. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что TVP имеет одну аминокислотную замену в положениях X_1, X_2, X_3, X_4 или X_5; и при этом X_6 и X_7 отсутствуют.

108. Штамм дрожжей по любому из пп. 103-105, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-15, 49-53 или 77-110.

109. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17-30, 54-58 или 117-150, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

110. Штамм дрожжей по п. 103, отличающийся тем, что дрожжевая клетка выбрана из любых видов, принадлежащих к Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Yarrowia или Schizosaccharomyces.

111. Штамм дрожжей по п. 110, отличающийся тем, что дрожжевая клетка выбрана из группы, состоящей из Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris.

112. Штамм дрожжей по п. 111, отличающийся тем, что дрожжевая клетка представляет собой Kluyveromyces lactis или Kluyveromyces marxianus.

113. Способ по п. 112, отличающийся тем, что дрожжевая клетка представляет собой Kluyveromyces lactis.

114. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемая соль.

115. TVP по п. 114, отличающийся тем, что если Z_1 представляет собой T или то TVP является гликозилированным.

116. TVP по п. 114, отличающийся тем, что X_1представляет собой Q и Z_1представляет собой A.

117. TVP по любому из пп. 114-116, отличающийся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

118. TVP по п. 116, отличающийся тем, что TVP кодируется полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 17, 54 или 56, или комплементарной ей нуклеотидной последовательностью.

119. Композиция, состоящая из TVP и одного или нескольких эксципиентов; при

этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; и при этом один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); лигносульфоната; гипса; сорбита; бензоата натрия; сорбата калия; ЭДТА; бензизотиазолинона (БИТ) и твердых продуктов ферментации.

120. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что если Z_1 представляет собой T, то TVP является гликозилированным.

121. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что X_1представляет собой Q и Z_1представляет собой A.

122. Композиция по любому из пп. 119-121, отличающаяся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

123. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

124. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

125. TVP по п. 124, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

126. TVP по п. 125, отличающийся тем, что расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

127. TVP по п. 125, отличающийся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

128. Композиция по любому из пп. 119-127, отличающаяся тем, что один или несколько эксципиентов выбраны из группы, состоящей из: трегалозы; мальтодекстрина; мальтозы; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4); одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4); БИТ и твердых продуктов ферментации.

129. Композиция по п. 128, отличающаяся тем, что TVP находится в диапазоне от около 2% до около 16% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 5% до около 40% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,01% до около 0,1% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 10% до около 50% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от

около 1% до около 5% масс./масс.; и одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,10% до около 1% масс./масс. и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 15% до около 40% масс./масс. от общей массы композиции.

130. Композиция по п. 129, отличающаяся тем, что TVP находится в диапазоне от около 7% до около 9% масс./масс.; и при этом трегалоза находится в диапазоне от около 20% до около 30% масс./масс.; БИТ находится в диапазоне от около 0,025% до около 0,075% масс./масс.; мальтодекстрин находится в диапазоне от около 30% до около 40% масс./масс.; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) находится в диапазоне от около 2% до около 3% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) находится в диапазоне от около 0,2% до около 0,6% и твердые продукты ферментации находятся в диапазоне от около 20% до около 30% от общей массы композиции.

131. Композиция по п. 130, отличающаяся тем, что TVP составляет около 8,5% масс./масс.; и при этом трегалоза составляет около 25% масс./масс.; БИТ составляет около 0,05% масс./масс.; мальтодекстрин составляет около 36,3 масс.%; безводный двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) составляет около 2,6% масс./масс.; одноосновный фосфат калия (KH_2PO_4) составляет около 0,4% масс./масс. и твердые вещества ферментации составляют около 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

132. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что композиция по сути состоит из следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

133. Композиция по п. 119, отличающаяся тем, что композиция состоит из следующего: TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс.; трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного фосфата калия двухосновного (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; фосфата калия одноосновного (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс. и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

134. Композиция, состоящая из TVP и множества эксципиентов; при этом TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности Формулы (II): E-P-D-E-I-C-R-A-X_1-M-T-N-K-E-F-T-Y-K-S-N-V-C-N-N-C-G-D-Q-V-A-A-C-E-A-E-C-F-R-N-D-V-Y-Z_1-A-C-H-E-A-Q-K-G; при этом полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно последовательности U1-агатоксин-Ta1b дикого типа, указанную в SEQ ID

NO:1, и при этом X_1 представляет собой R или Q; и Z_1 представляет собой T или A; или его фармацевтически приемлемой соли; при этом композиция состоит из TVP в количестве, составляющем 8,5% масс./масс. от общей массы композиции; и при этом множество эксципиентов состоит из следующего: трегалозы в количестве, составляющем 25% масс./масс.; БИТ в количестве, составляющем 0,05% масс./масс.; мальтодекстрина в количестве, составляющем 36,3% масс./масс.; безводного двухосновного фосфата калия (K_2HPO_4) в количестве, составляющем 2,6% масс./масс.; одноосновного фосфата калия (KH_2PO_4) в количестве, составляющем 0,4% масс./масс.; и твердых продуктов ферментации в количестве, составляющем 26,85% масс./масс. от общей массы композиции.

135. Композиция по п. 134, отличающаяся тем, что если Z_1 представляет собой T или то TVP является гликозилированным.

136. Композиция по п. 134, отличающаяся тем, что X_1представляет собой Q и Z_1представляет собой A.

137. Композиция по любому из пп. 134-136, отличающаяся тем, что TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

138. Композиция по п. 134, отличающаяся тем, что TVP дополнительно содержит гомополимер или гетерополимер двух или более TVP, при этом аминокислотная последовательность каждого TVP является одинаковой или разной.

139. Композиция по п. 134, отличающаяся тем, что TVP представляет собой слитый белок, содержащий два или более TVP, разделенных расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером, и при этом аминокислотная последовательность каждого TVP может быть одинаковой или разной.

140. TVP по п. 139, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

141. TVP по п. 140, отличающийся тем, что расщепляемый линкер расщепляется внутри кишечника или гемолимфы насекомого.

142. TVP по п. 141, отличающийся тем, что линкер имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61-70.

143. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

144. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

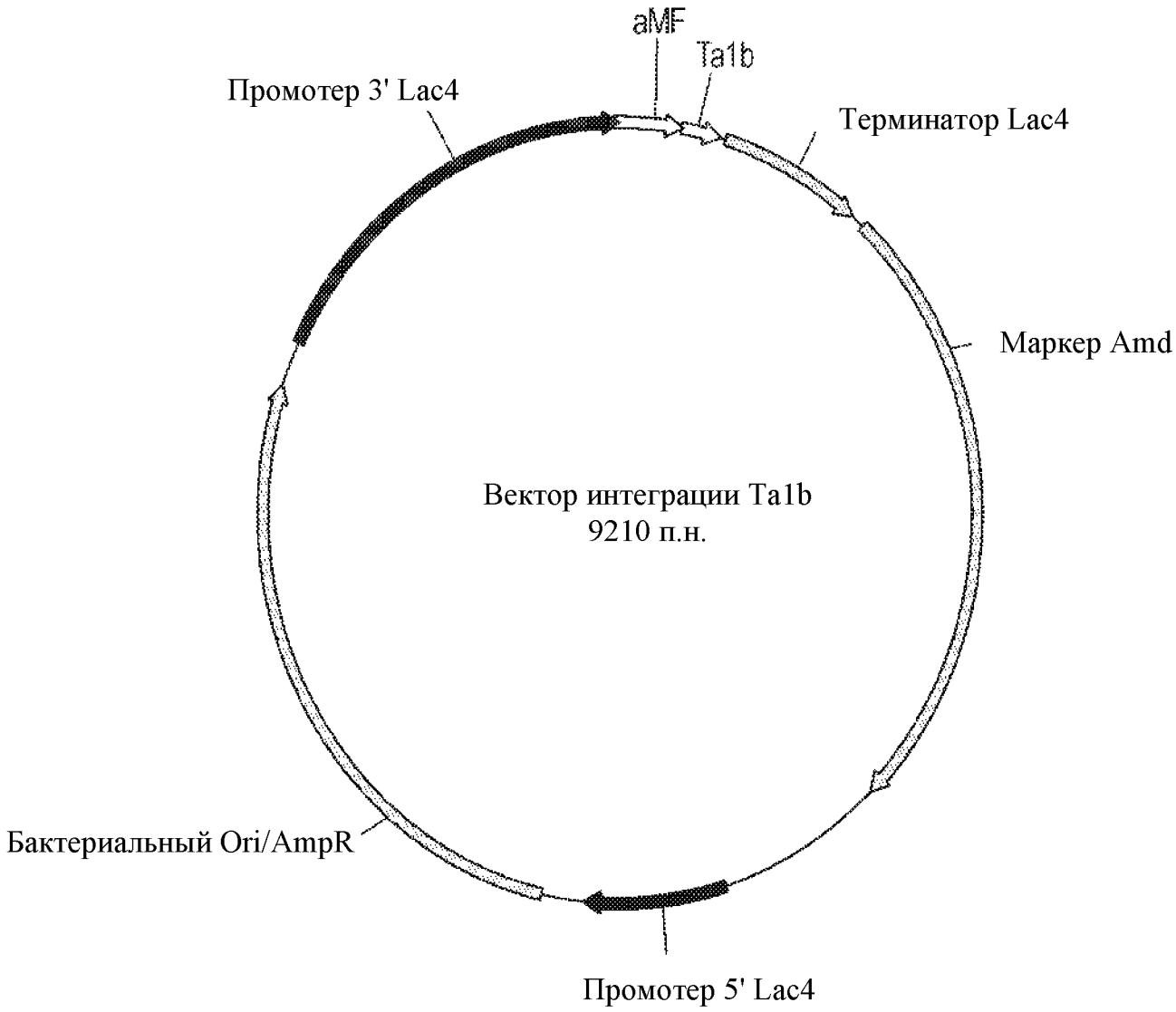
145. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 49 или 51; или его фармацевтически приемлемая соль.

146. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

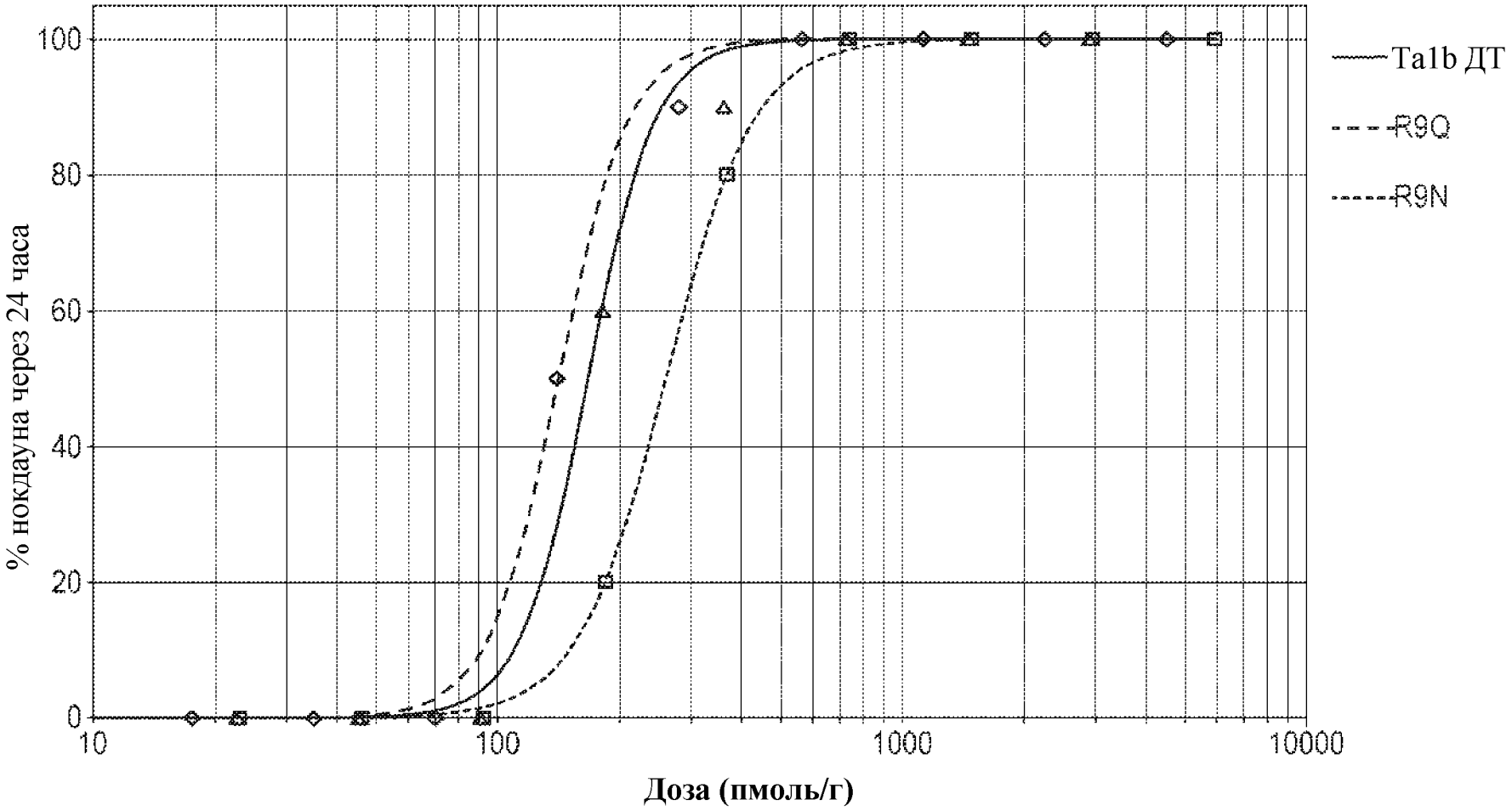
147. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

148. Инсектицидный вариант полипептида U_1-агатоксин-Ta1b (TVP), при этом указанный TVP состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: или 51, или его фармацевтически приемлемая соль.

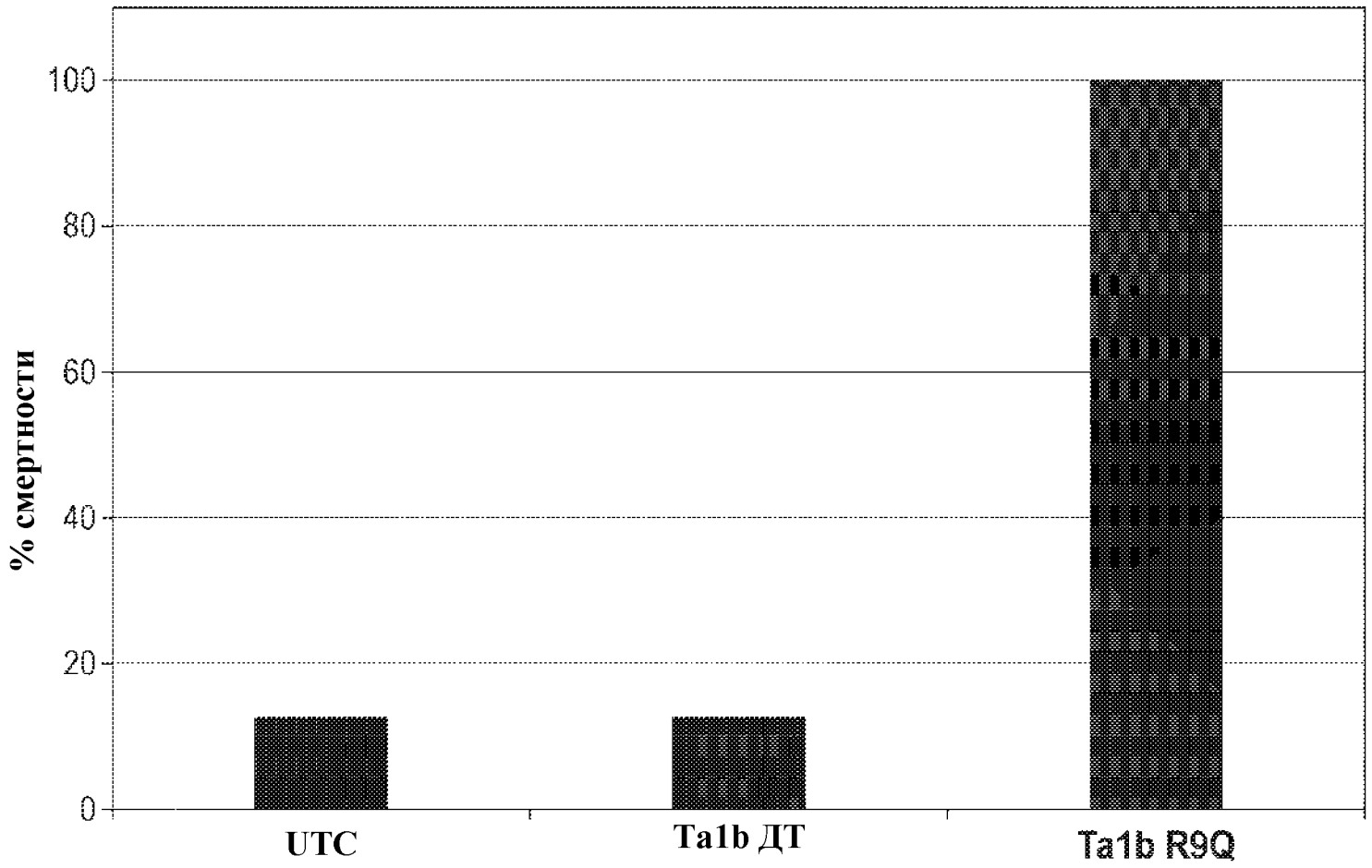
По доверенности


aMF
Ta1b
Промотер 3' Lac4
Терминатор Lac4
Маркер Amd
Вектор интеграции Ta1b
9210 п.н.
Бактериальный Ori/AmpR
Промотер 5' Lac4

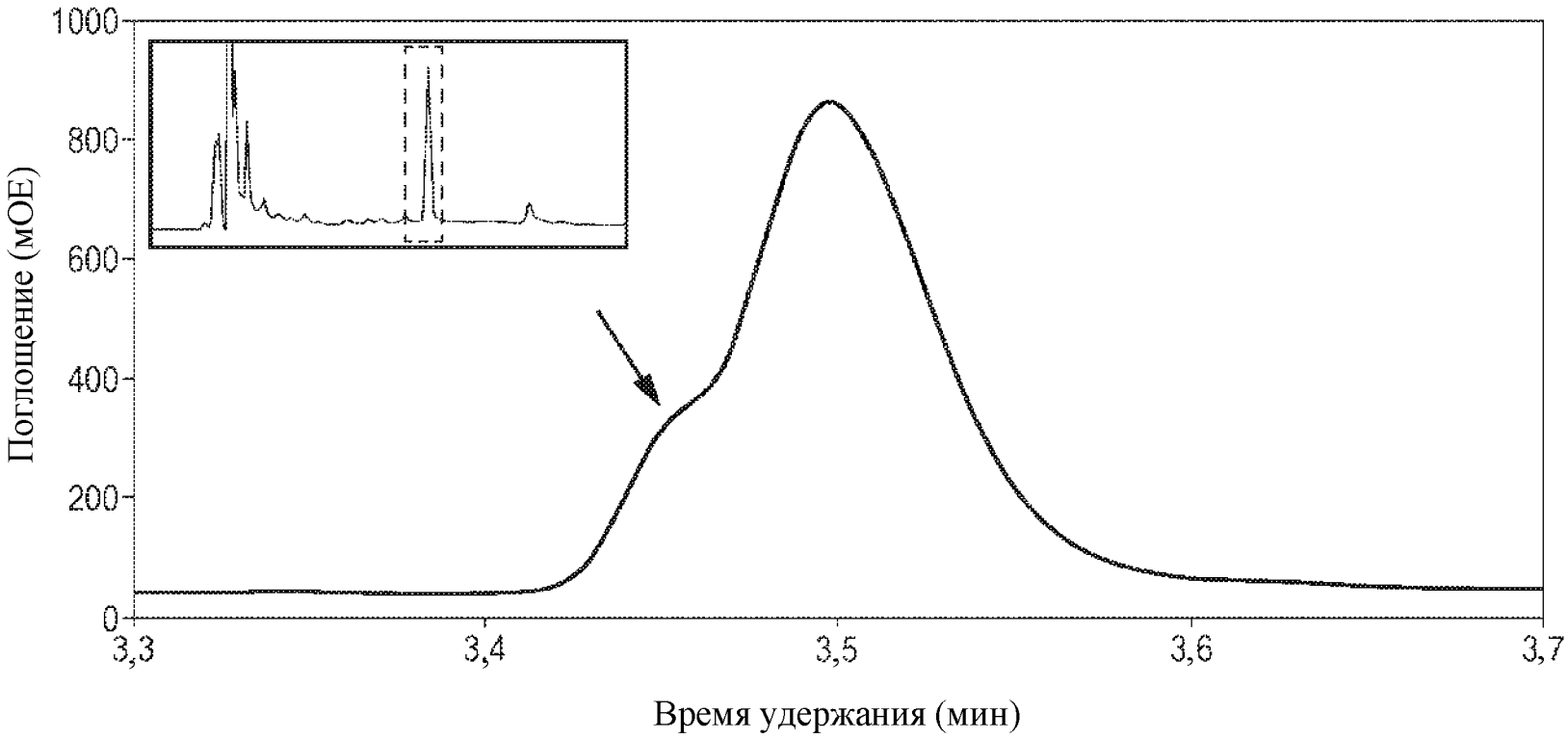
ФИГ. 1


100
80
60
40
20
0
% нокдауна через 24 часа
10
100
1000
10000
Доза (пмоль/г)
Ta1b ДТ
R9Q
R9N

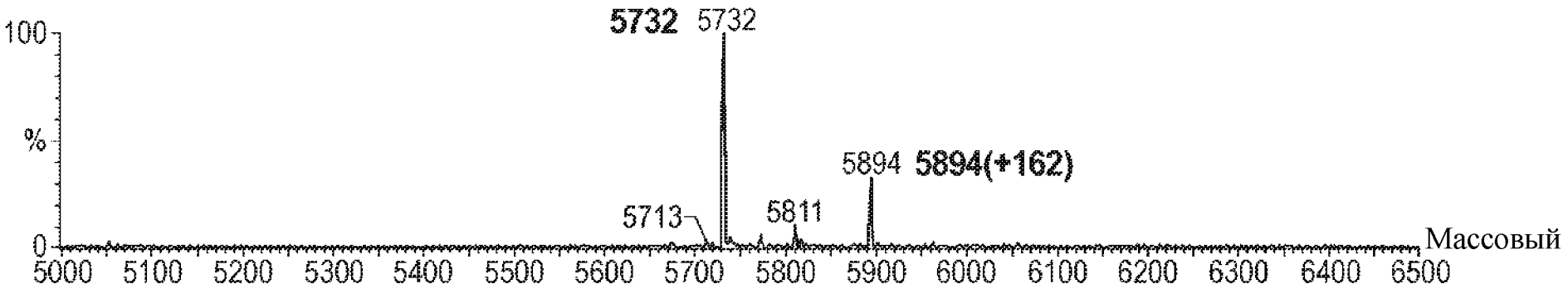
ФИГ. 2



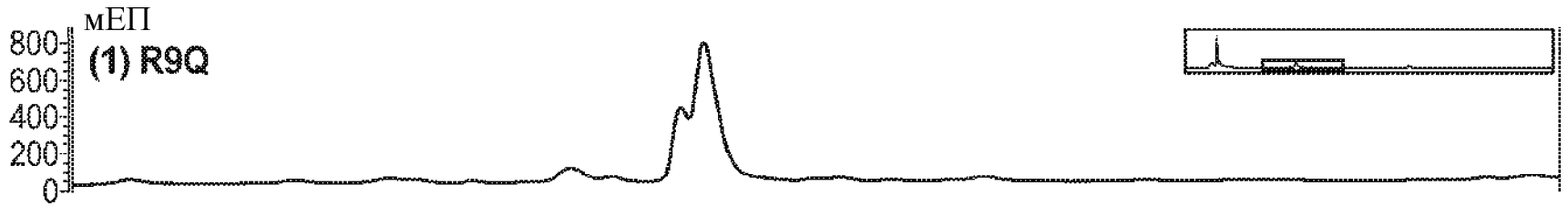
ФИГ. 3


1000
800
600
400
200
0
Поглощение (мОЕ)
3,3
3,4
3,5
3,6
3,7
Время удержания (мин)

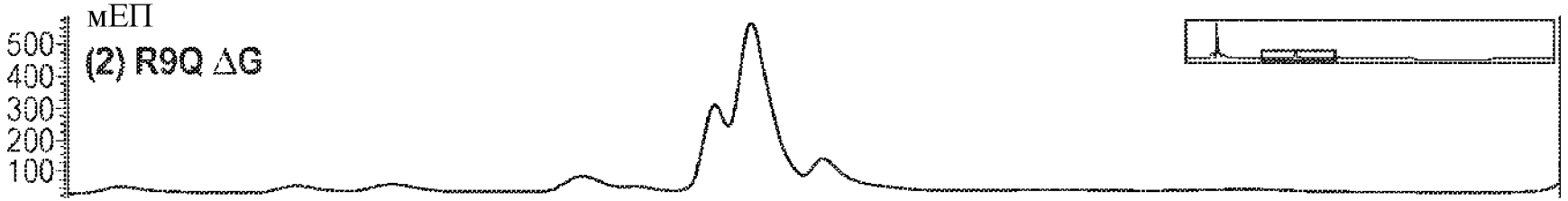
ФИГ. 4


100
%
0
5732
5732
5894
5894(+162)
5713
5811
Массовый
5000
5100
5200
5300
5400
5500
5600
5700
5800
5900
6000
6100
6200
6300
6400
6500

ФИГ. 5


мЕП
800
600
400
200
0
(1) R9Q

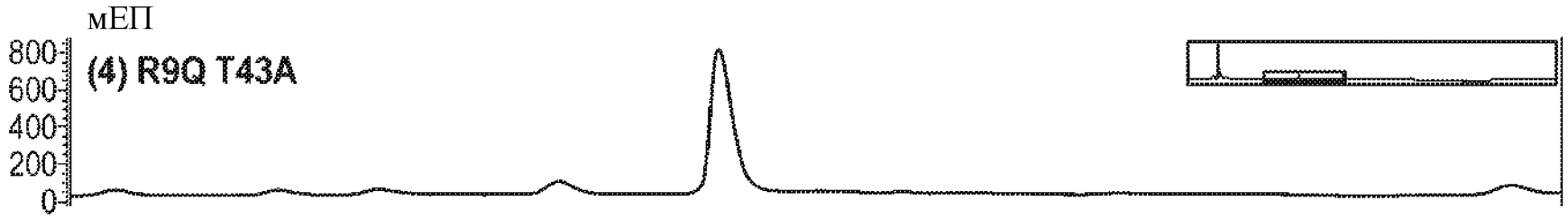
ФИГ. 6


мЕП
500
400
300
200
100
(2) R9Q ΔG

ФИГ. 7


мЕП
400
300
200
100
0
(3) R9Q T43A ΔG

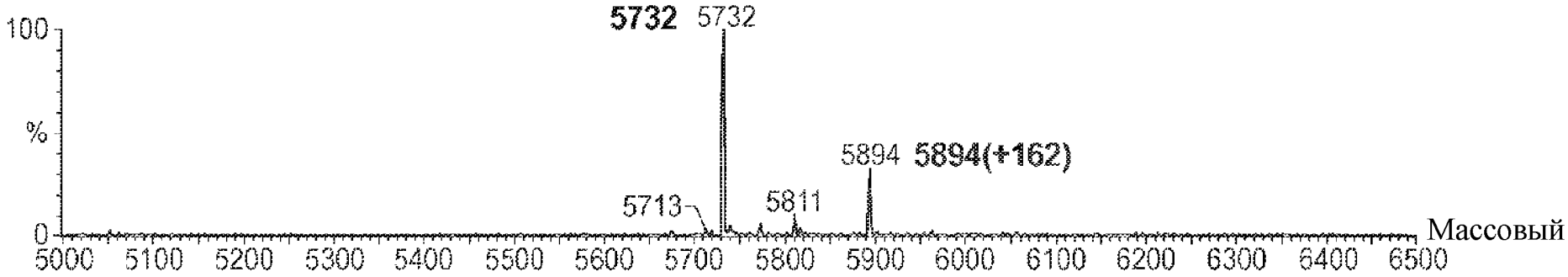
ФИГ. 8


мЕП
800
600
400
200
0
(4) R9Q T43A

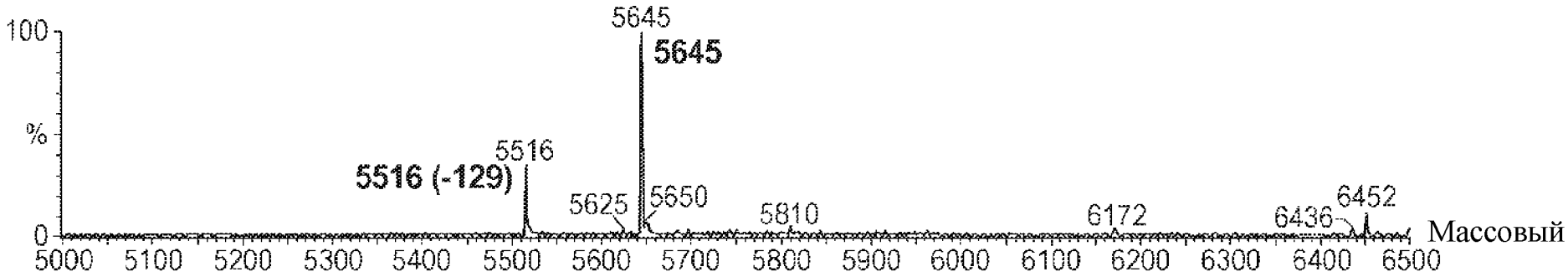
ФИГ. 9


мЕП
800
600
400
200
0
(5) R9Q T43A ΔK-G

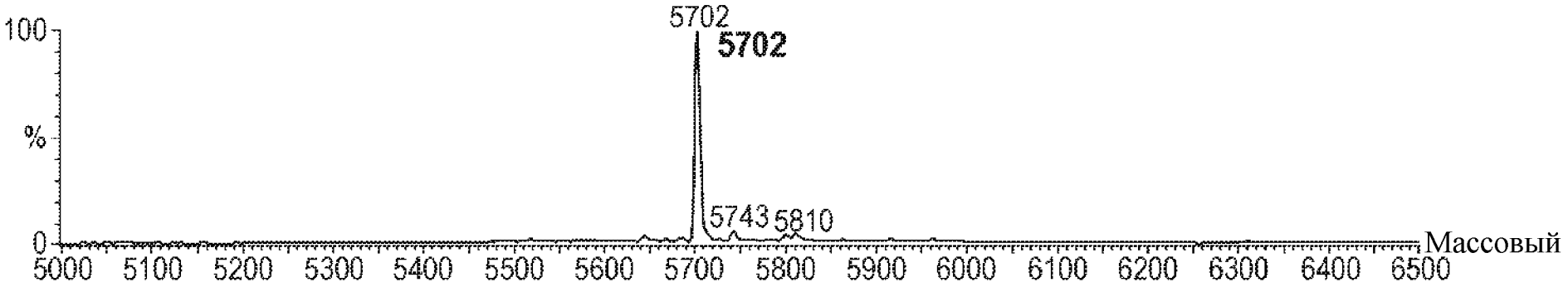
ФИГ. 10


100
%
0
5732
5732
5894
5894(+162)
5713
5811
Массовый
5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500

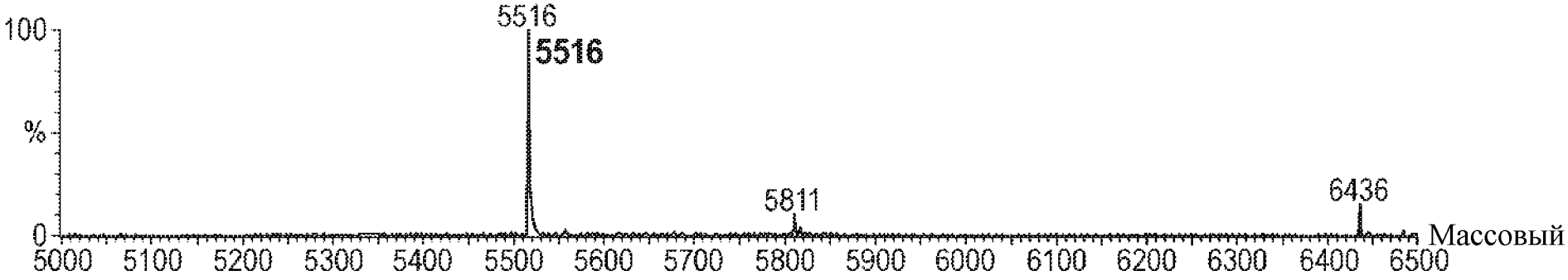
ФИГ. 11


100
%
0
5645
5645
5516
5516 (-129)
5625
5650
5810
6172
6436
6452
Массовый
5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500

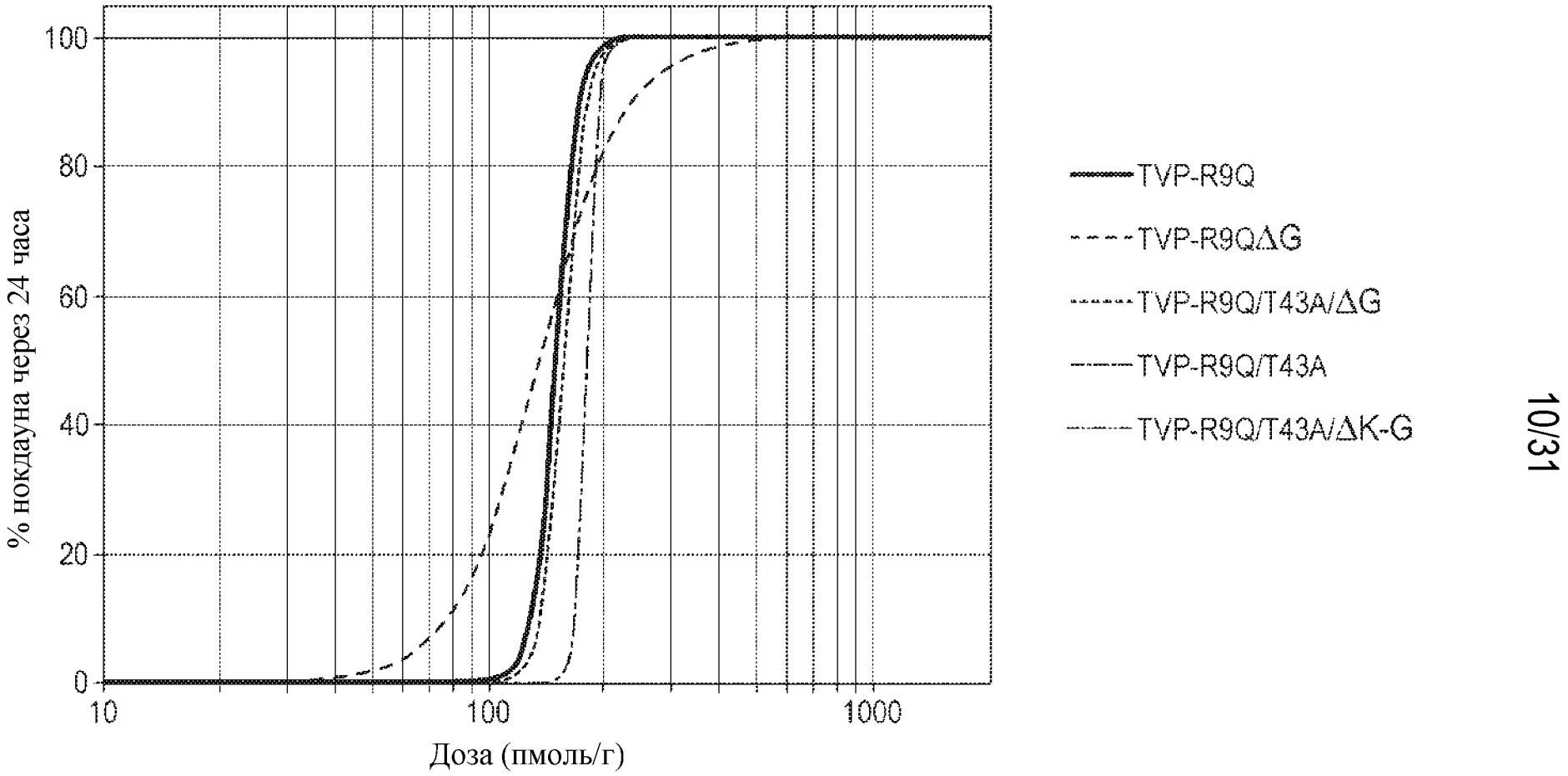
ФИГ. 12


100
%
0
5702
5702
5743
5810
Массовый
5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500

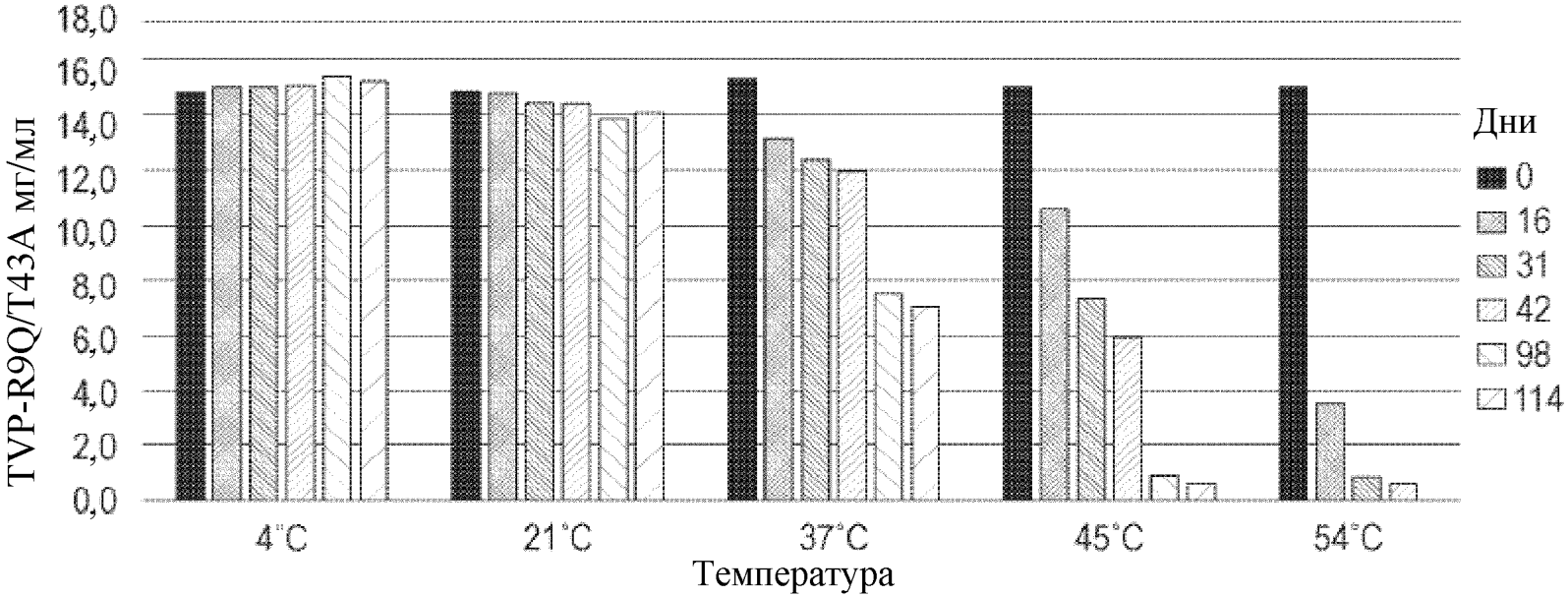
ФИГ. 13


100
%
0
5516
5516
5811
6436
Массовый
5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500

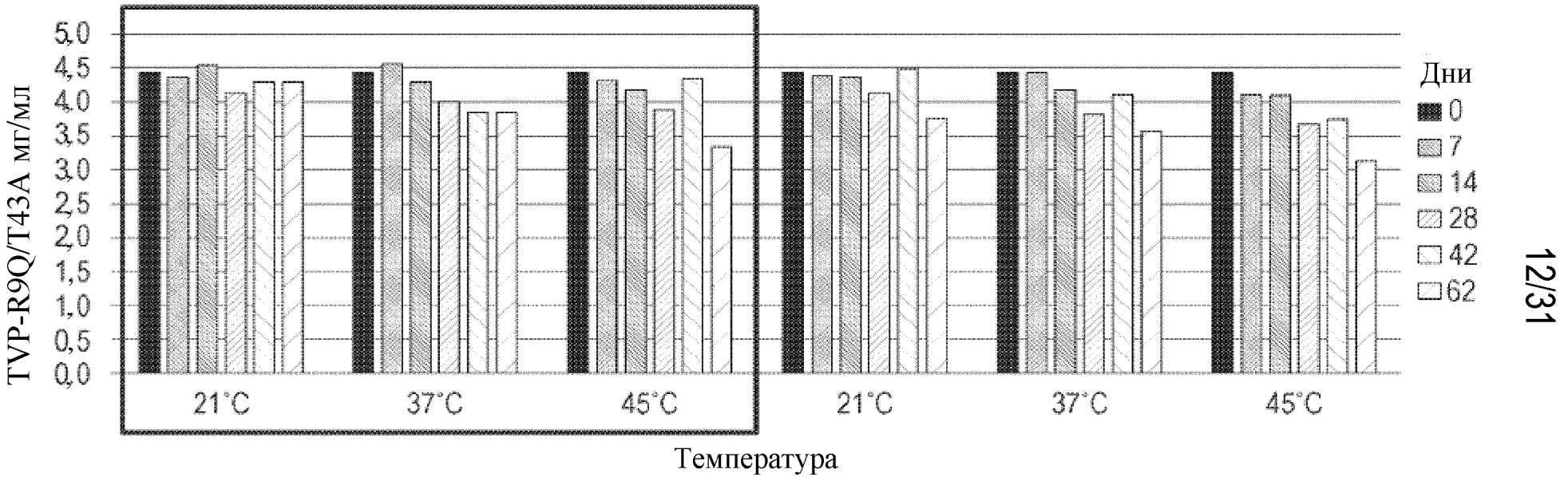
ФИГ. 14


% нокдауна через 24 часа
100
80
60
40
20
0
10
100
1000
Доза (пмоль/г)
TVP-R9Q
TVP-R9QΔG
TVP-R9Q/T43A/ΔG
TVP-R9Q/T43A
TVP-R9Q/T43A/ΔK-G

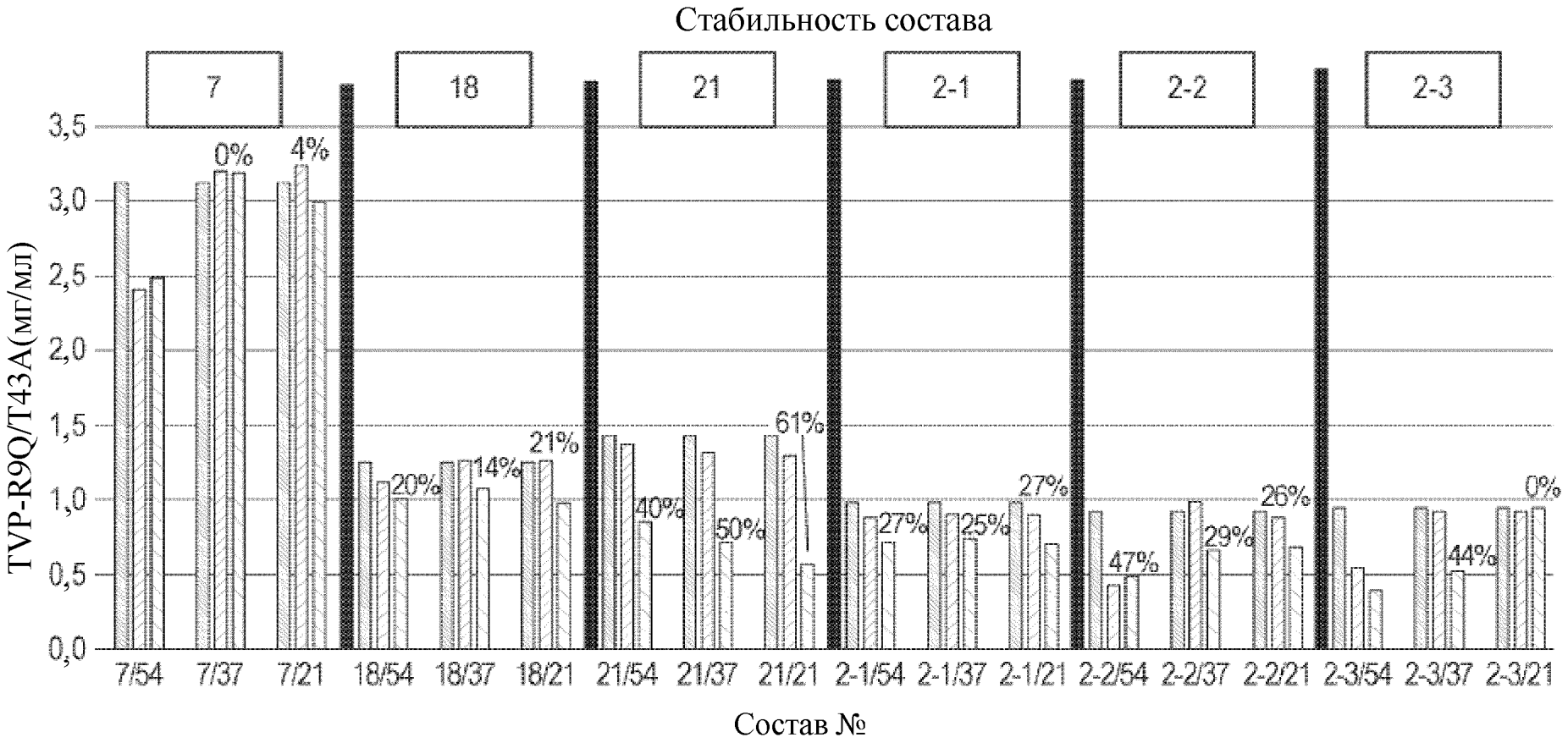
ФИГ. 15


18,0
16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
TVP-R9Q/T43A мг/мл
4°C
21°C
37°C
45°C
54°C
Температура
Дни
0
16
31
42
98
114

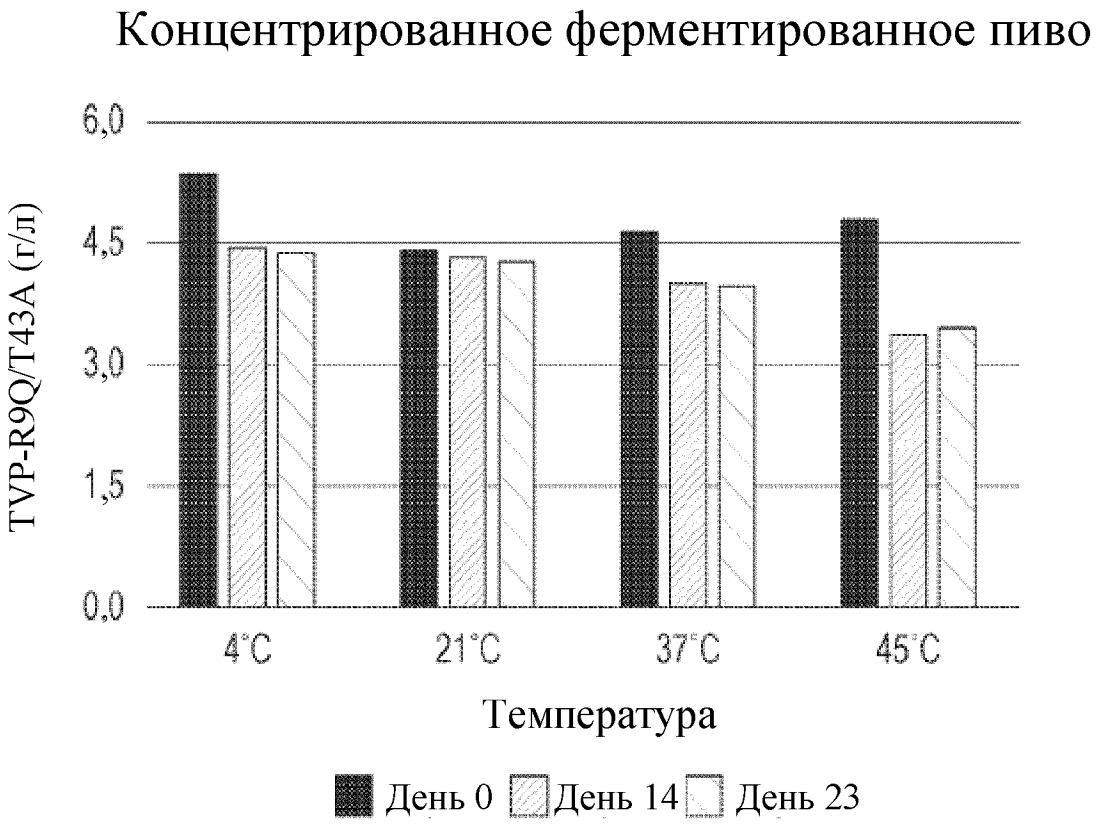
ФИГ. 16


TVP-R9Q/T43A мг/мл
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
21°C
37°C
45°C
21°C
37°C
45°C
Температура
Дни
0
7
14
28
42
62

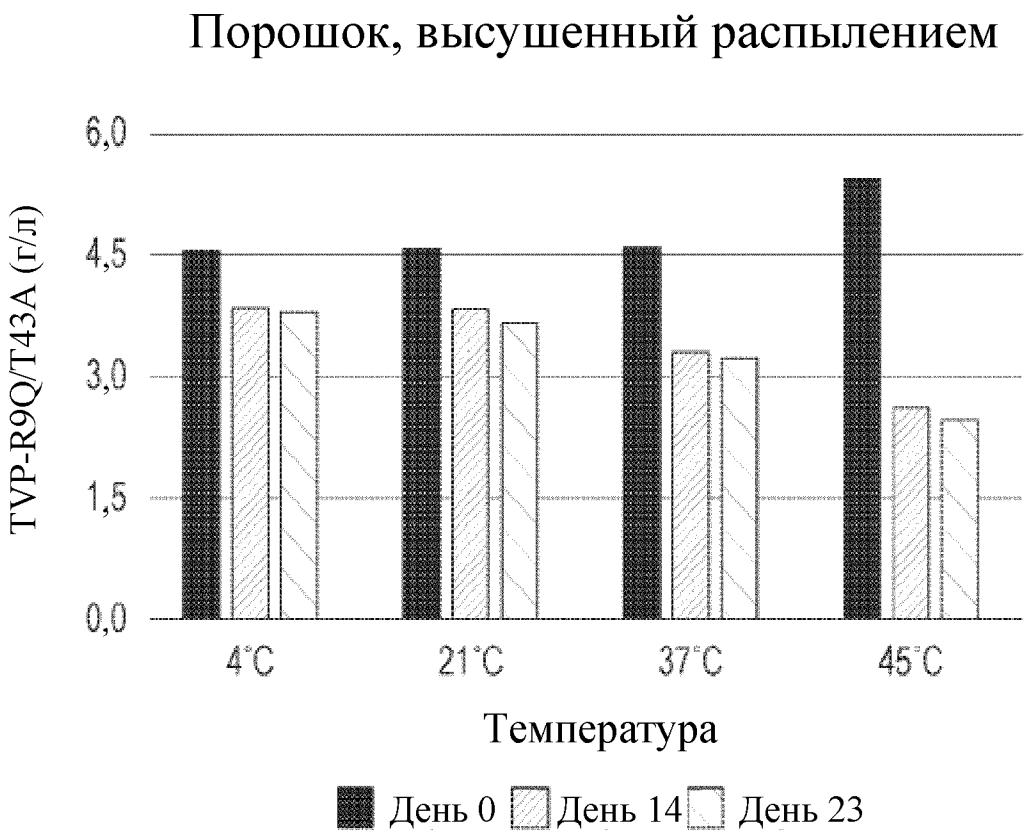
ФИГ. 17


Стабильность состава
7
18
21
2-1
2-2
2-3
TVP-R9Q/T43A(мг/мл)
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0%
4%
20%
14%
21%
40%
50%
61%
27%
25%
27%
47%
29%
26%
44%
0%
7/54
7/37
7/21
18/54
18/37
18/21
21/54
21/37
21/21
2-1/54
2-1/37
2-1/21
2-2/54
2-2/37
2-2/21
2-3/54
2-3/37
2-3/21
Состав №

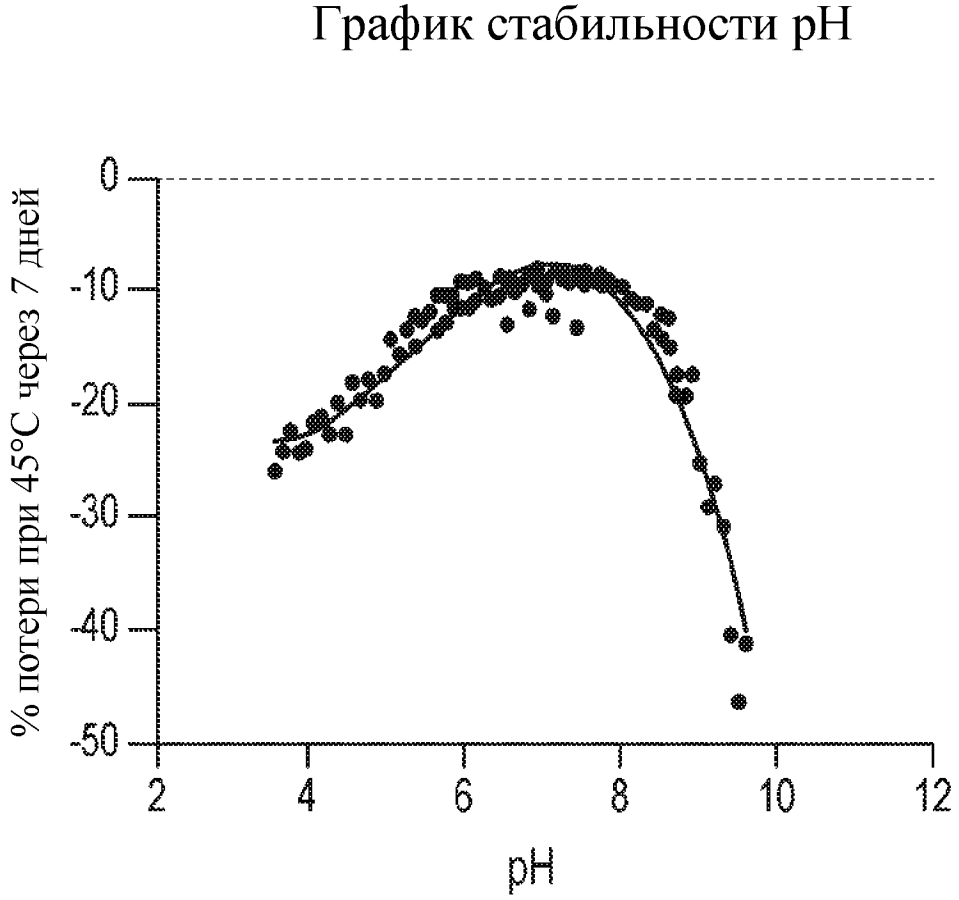
ФИГ. 18


Концентрированное ферментированное пиво
6,0
4,5
3,0
1,5
0,0
TVP-R9Q/T43A (г/л)
4°C
21°C
37°C
45°C
Температура
День 0
День 14
День 23

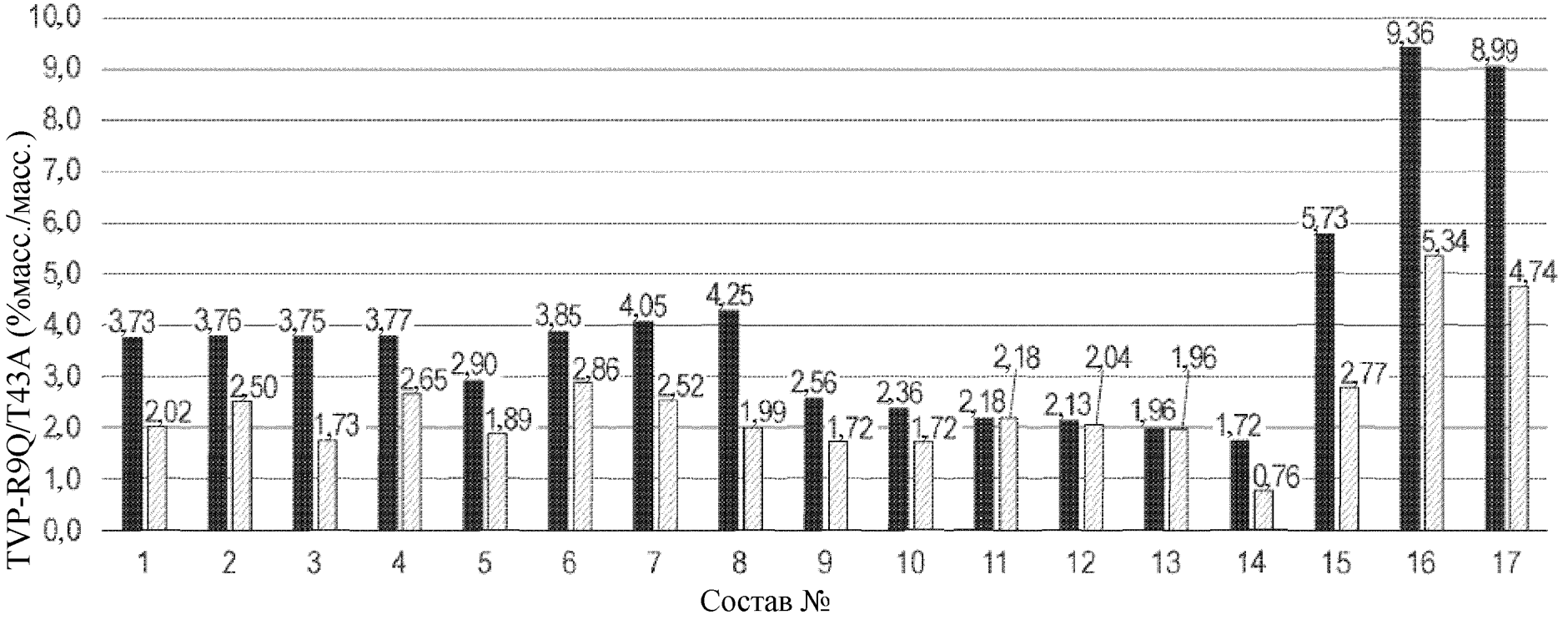
ФИГ. 19


Порошок, высушенный распылением
TVP-R9Q/T43A (г/л)
6,0
4,5
3,0
1,5
0,0
4°C
21°C
37°C
45°C
Температура
День 0
День 14
День 23

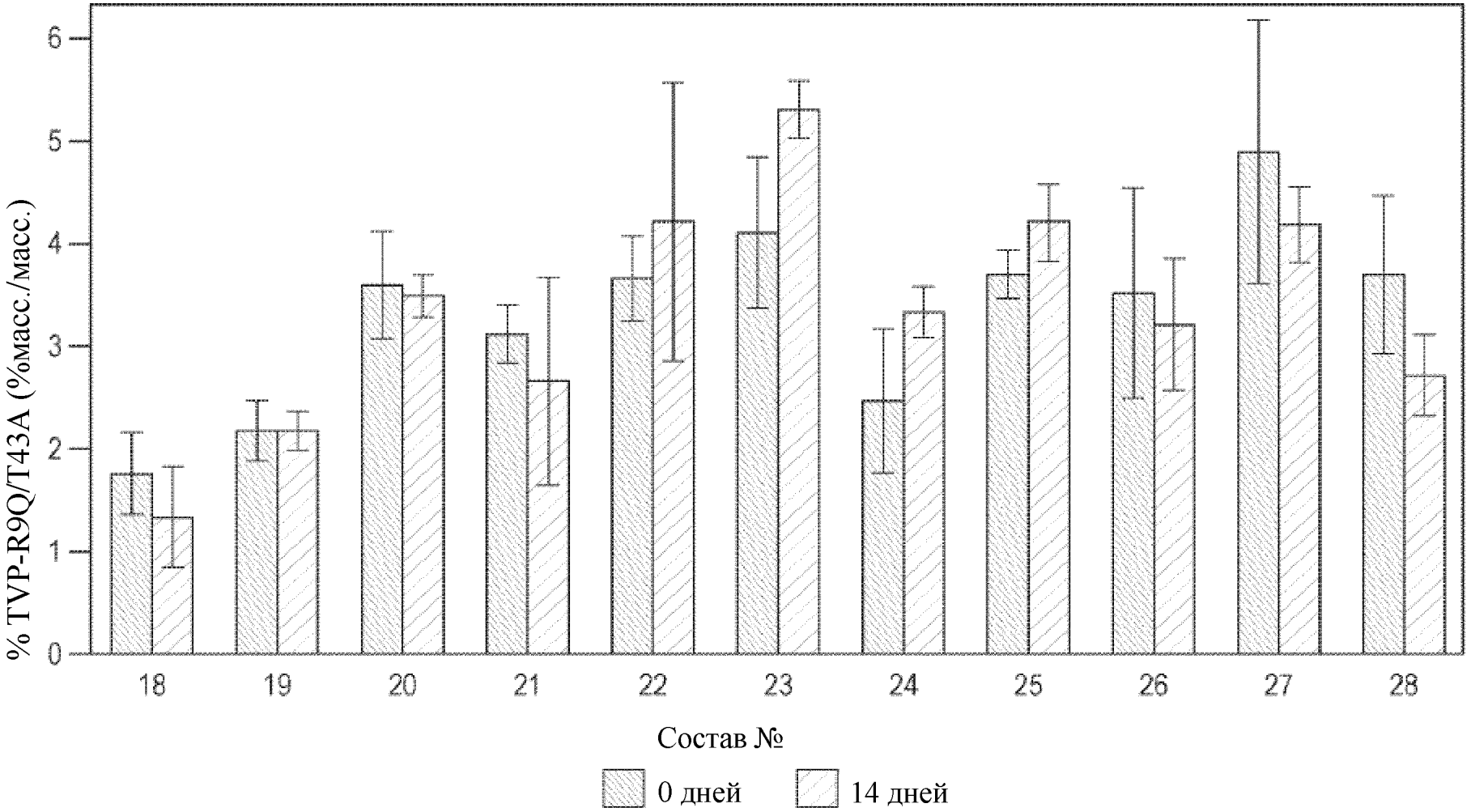
ФИГ. 20


График стабильности pH
% потери при 45°C через 7 дней
0
-10
-20
-30
-40
-50
2
4
6
8
10
12
pH

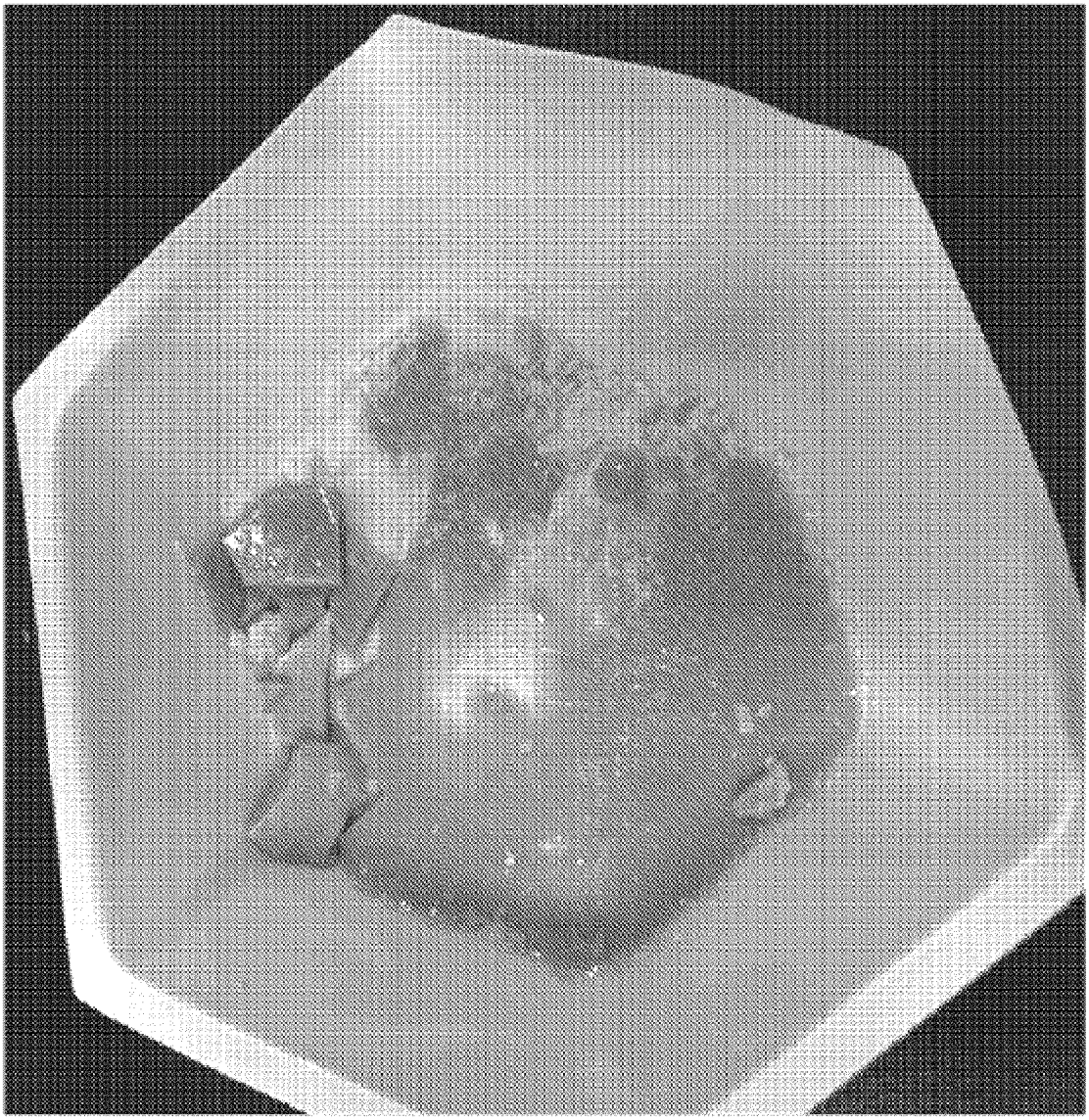
ФИГ. 21


TVP-R9Q/T43A (%масс./масс.)
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
3,73
2,02
3,76
2,50
3,75
1,73
3,77
2,65
2,90
1,89
3,85
2,86
4,05
2,52
4,25
1,99
2,56
1,72
2,36
1,72
2,18
2,18
2,13
2,04
1,96
1,96
1,72
0,76
5,73
2,77
9,36
5,34
8,99
4,74
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
Состав №

ФИГ. 22


% TVP-R9Q/T43A (%масс./масс.)
0
1
2
3
4
5
6
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
Состав №
0 дней
14 дней

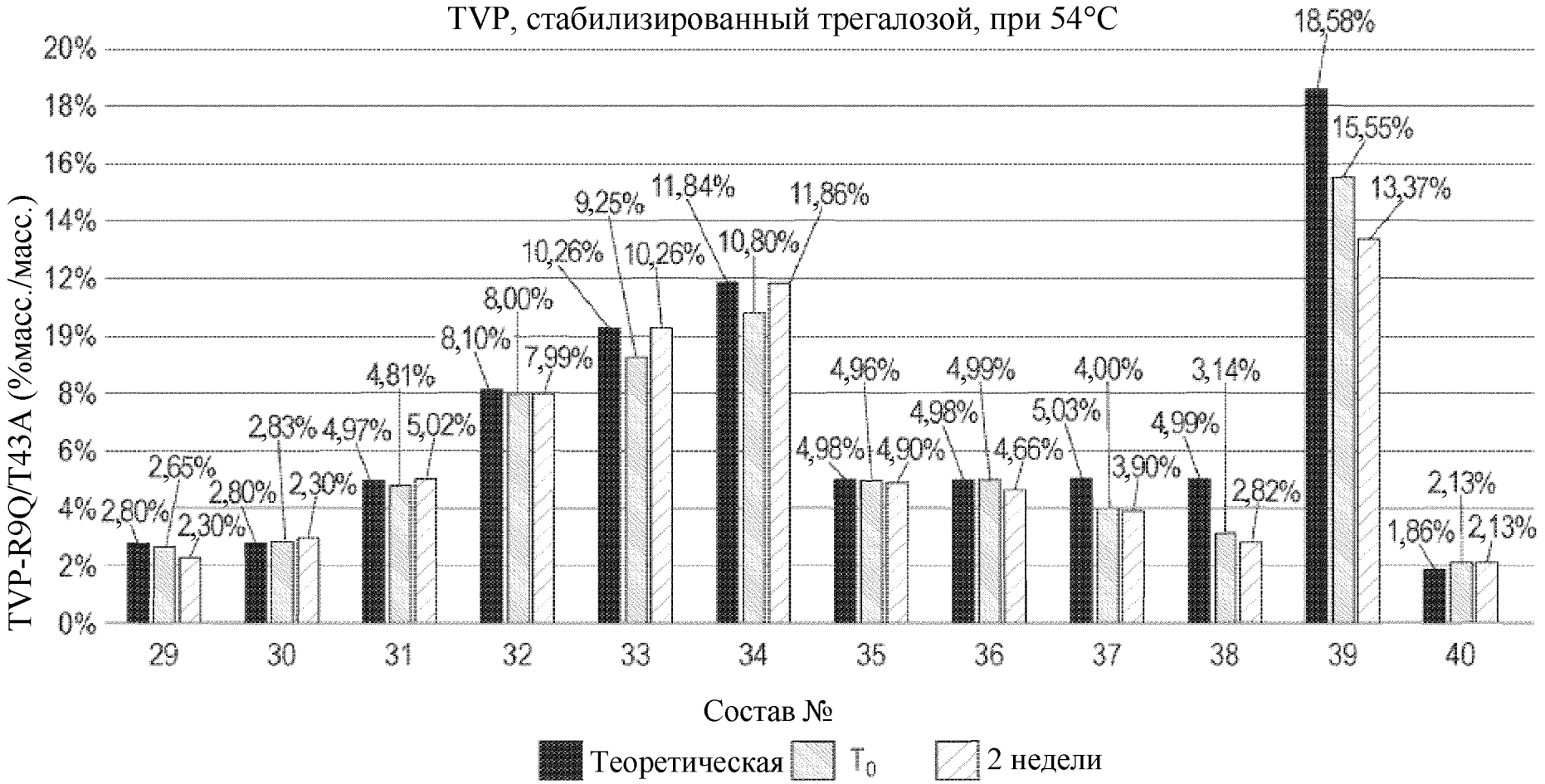
ФИГ. 23



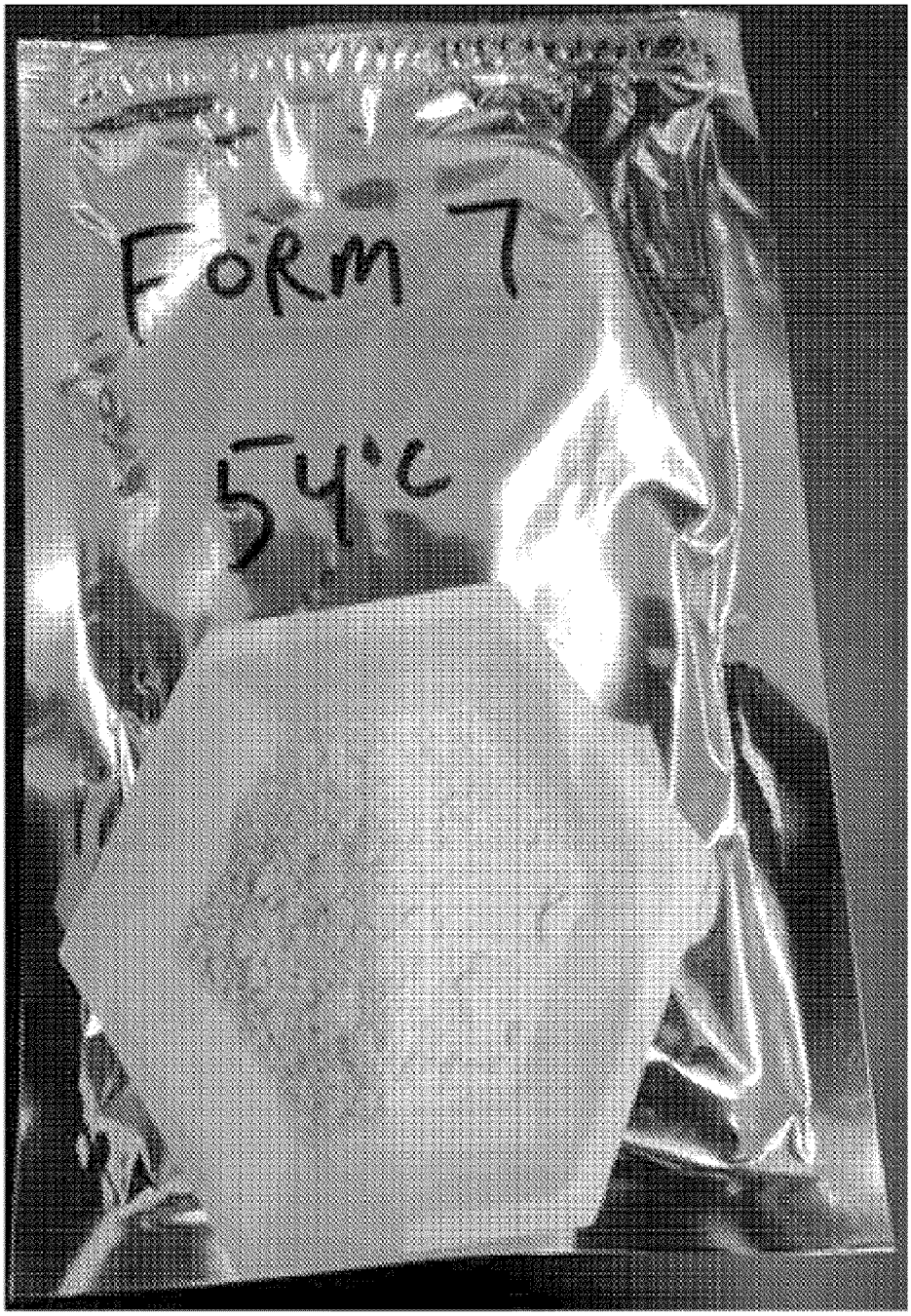
ФИГ. 24



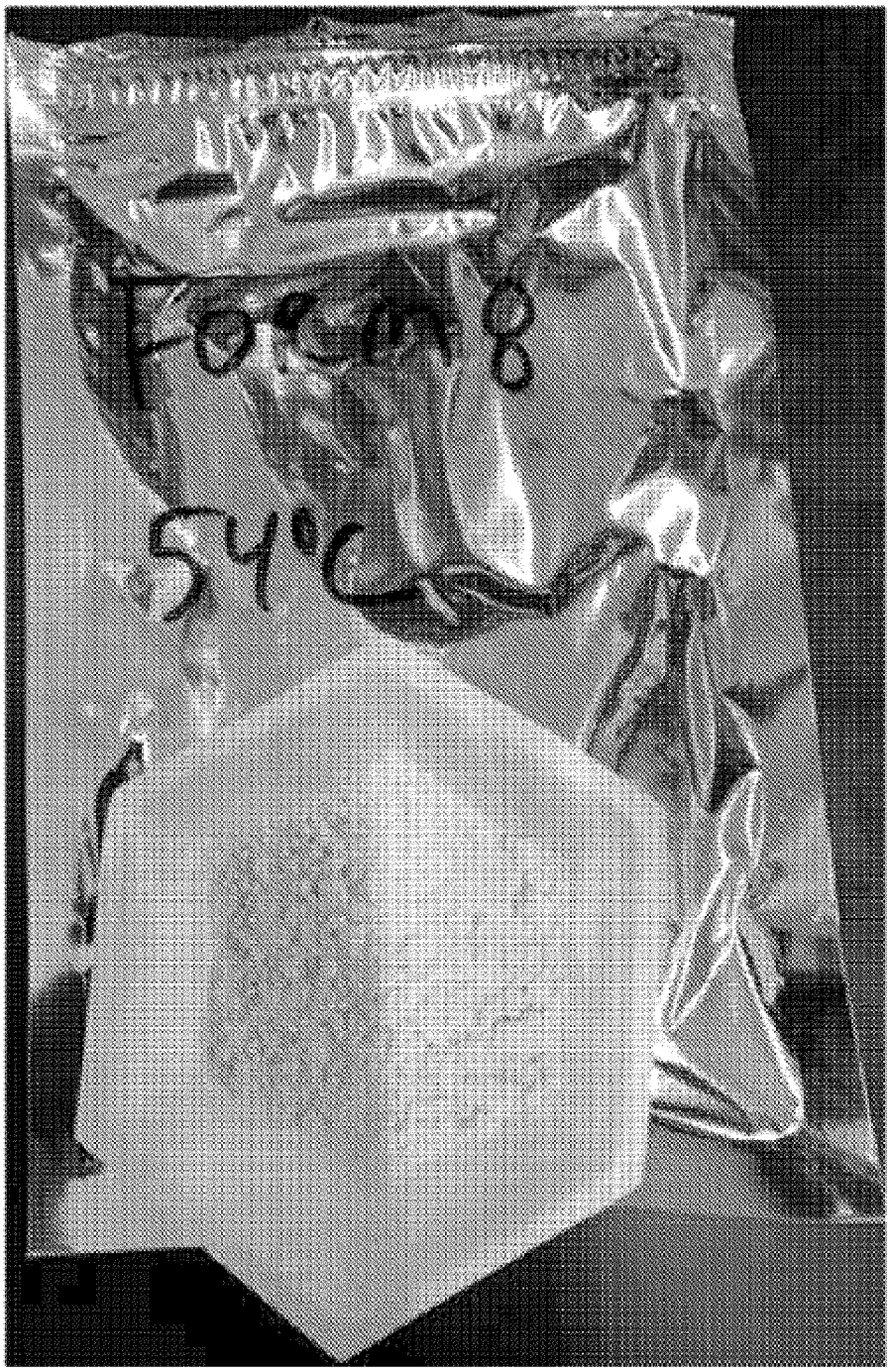
ФИГ. 25


TVP, стабилизированный трегалозой, при 54°C
TVP-R9Q/T43A (%масс./масс.)
20%
18%
16%
14%
12%
19%
8%
6%
4%
2%
0%
2,80%
2,65%
2,30%
2,80%
2,83%
2,30%
4,97%
4,81%
5,02%
8,10%
8,00%
7,99%
10,26%
9,25%
10,26%
11,84%
10,80%
11,86%
4,98%
4,96%
4,90%
4,98%
4,99%
4,66%
5,03%
4,00%
3,90%
4,99%
3,14%
2,82%
18,58%
15,55%
13,37%
1,86%
2,13%
2,13%
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
Состав №
Теоретическая
T_0
2 недели

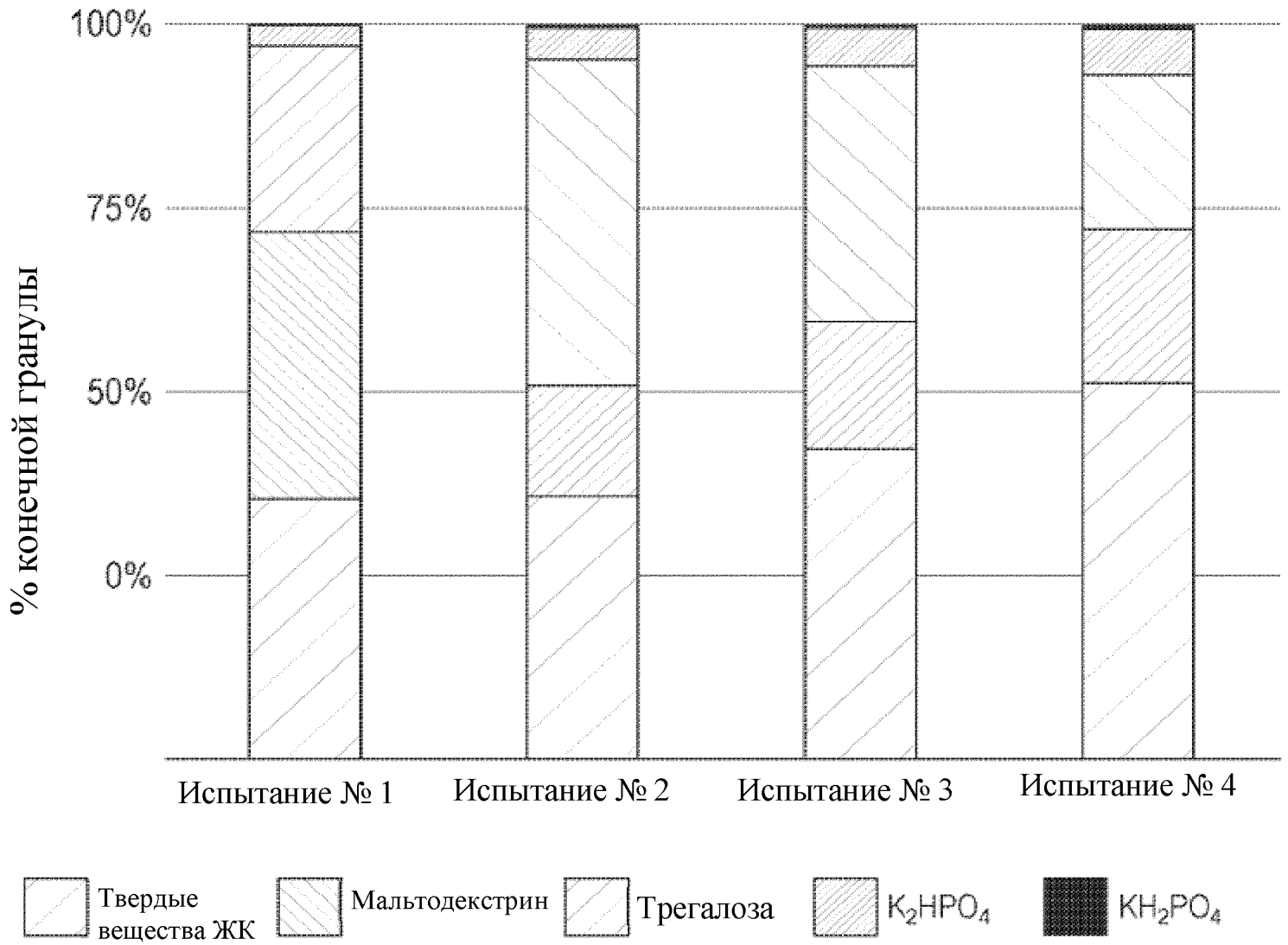
ФИГ. 26



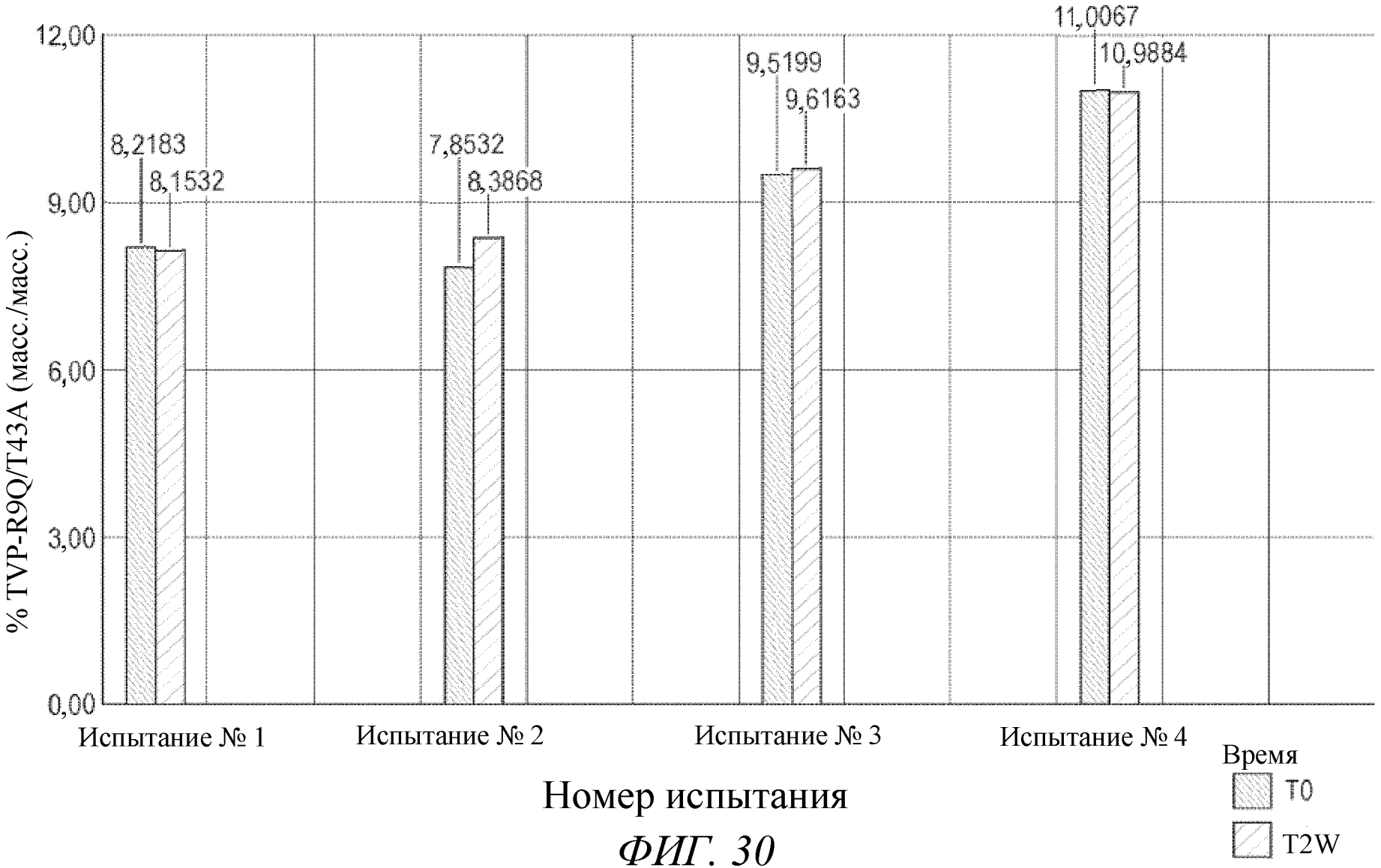
ФИГ. 27



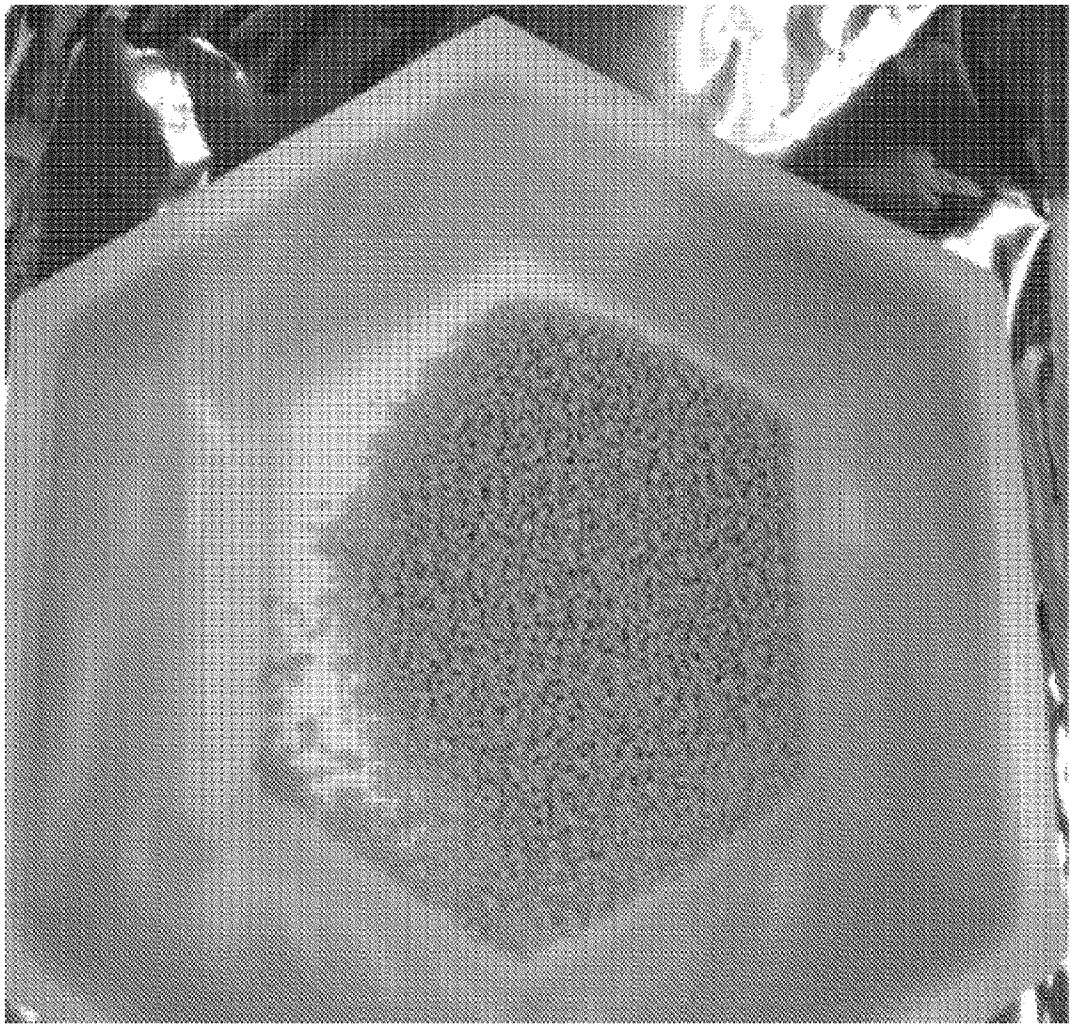
ФИГ. 28


100%
75%
50%
0%
% конечной гранулы
Испытание № 1
Испытание № 2
Испытание № 3
Испытание № 4
Твердые вещества ЖК
Мальтодекстрин
Трегалоза
K_2HPO_4
KH_2PO_4

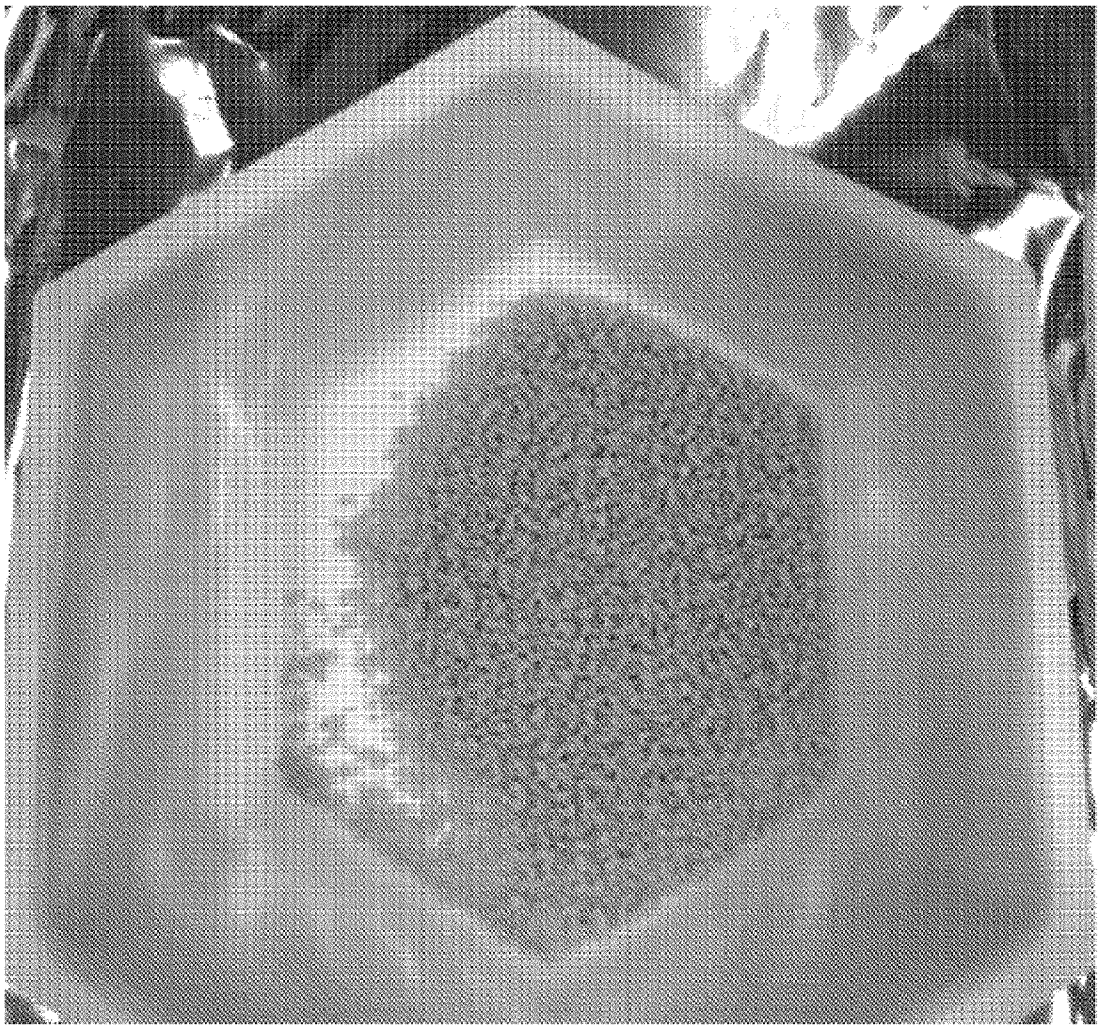
ФИГ. 29


12,00
9,00
6,00
3,00
0,00
% TVP-R9Q/T43A (масс./масс.)
8,2183
8,1532
7,8532
8,3868
9,5199
9,6163
11,0067
10,9884
Испытание № 1
Испытание № 2
Испытание № 3
Испытание № 4
Номер испытания
Время
T0
T2W

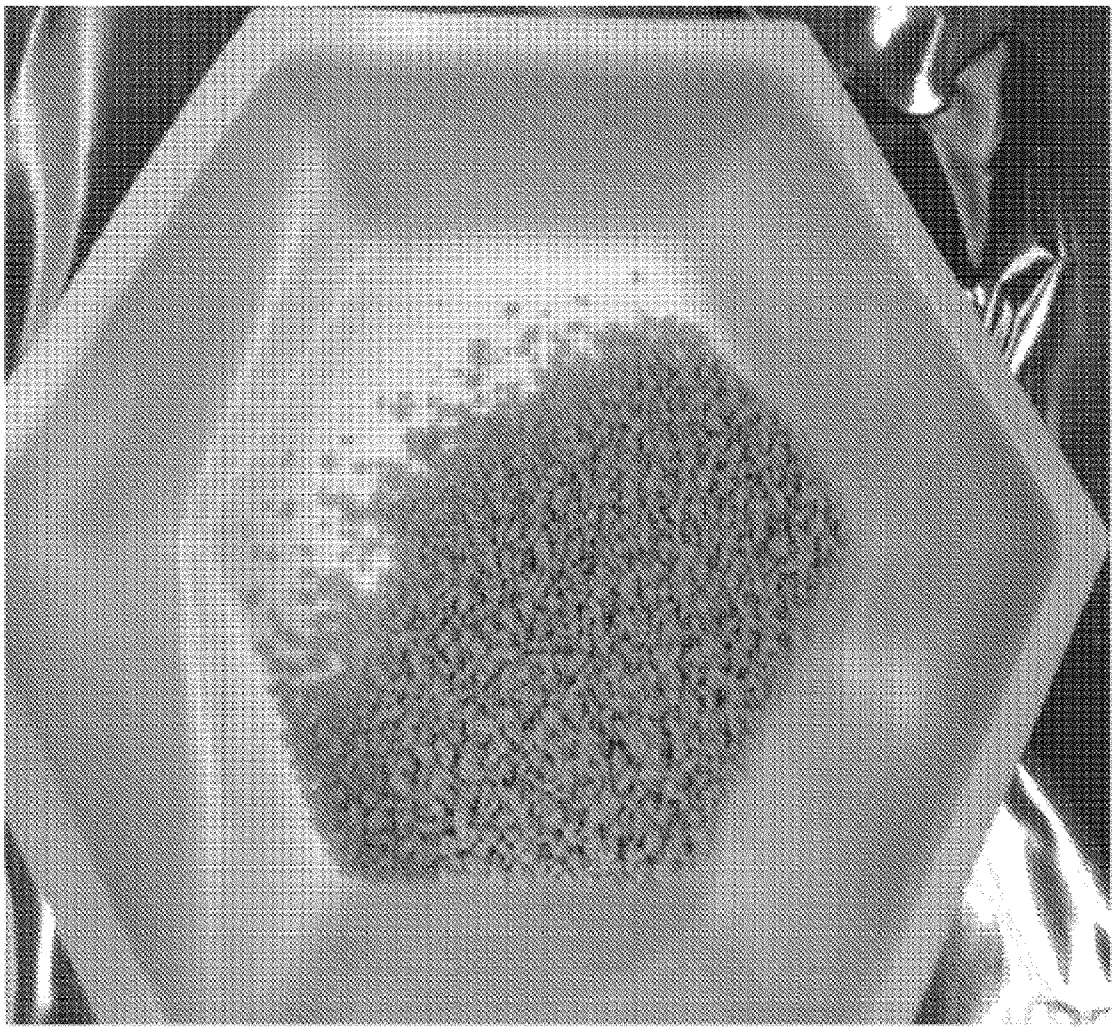
ФИГ. 30



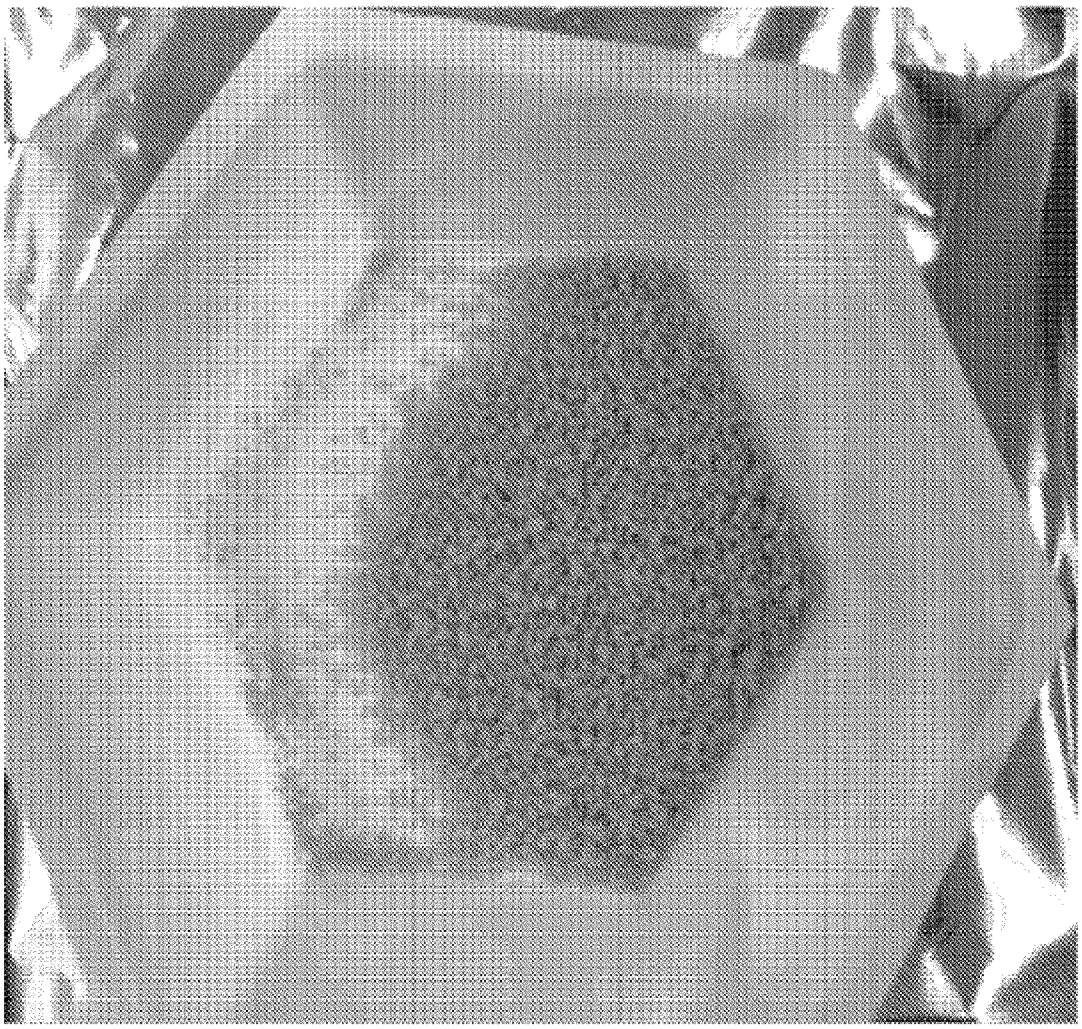
ФИГ. 31



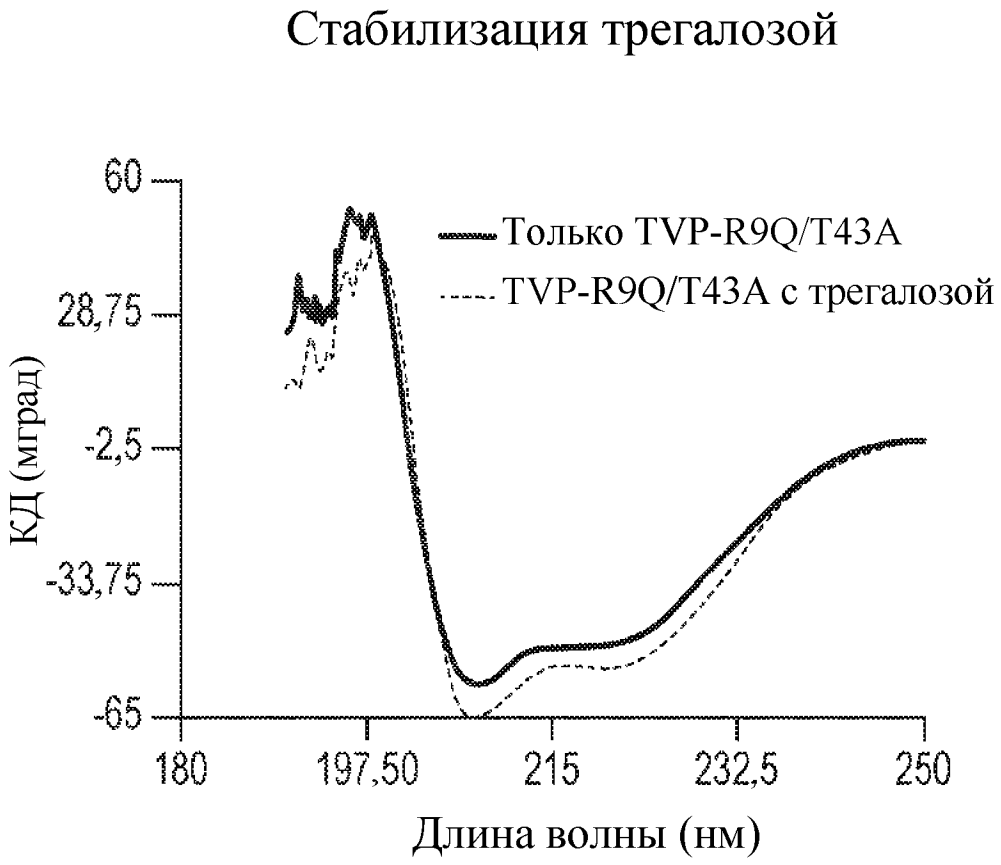
ФИГ. 32



ФИГ. 33

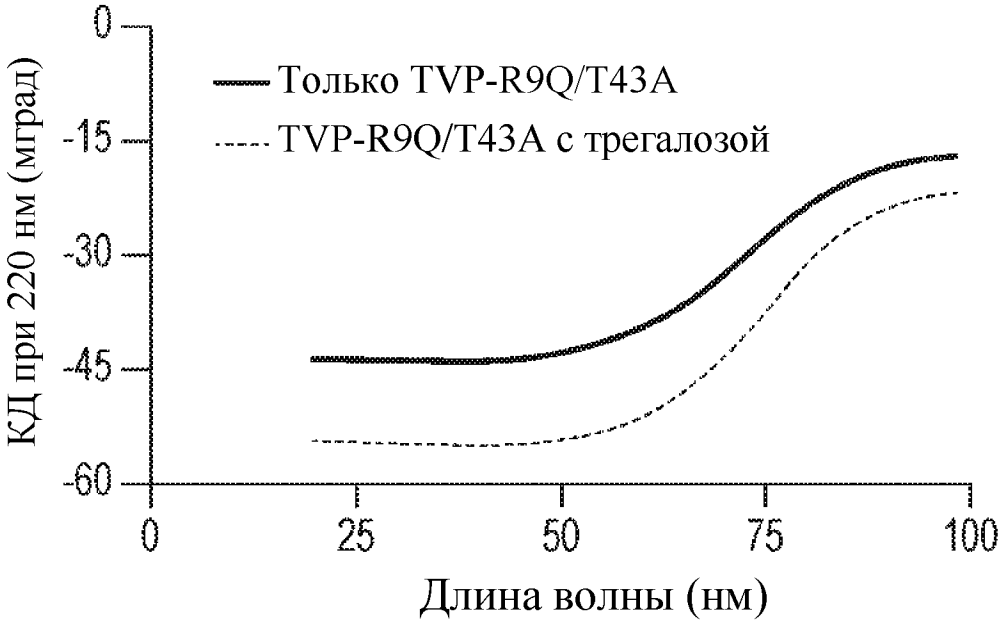


ФИГ. 34


Стабилизация трегалозой
60
28,75
-2,5
-33,75
-65
КД (мград)
180
197,50
215
232,5
250
Длина волны (нм)
Только TVP-R9Q/T43A
TVP-R9Q/T43A с трегалозой

ФИГ. 35

Стабилизация расплава трегалозой



ФИГ. 36