



(51) МПК
A01H 3/04 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012156243/10, 24.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 24.05.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 25.05.2010 EP 10382143.5

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2014 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 20.04.2016 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 25.12.2012

(86) Заявка РСТ:
 EP 2011/058464 (24.05.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2011/147826 (01.12.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

**МАРТИНЕС РАМИРЕС Альфредо (ES),
 АРЕНАС ВИДАЛЬ Хорхе Конрадо (ES)**

(73) Патентообладатель(и):

БАЙОМАСС БУСТЕР, С.Л. (ES)

(54) СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОМАССЫ РАСТЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к способу увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, который включает культивирование указанного фотосинтезирующего организма в присутствии пептида. Также раскрыта генная конструкция для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, а также вектор, ее включающий.

Изобретение также относится к клетке для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, а также к самому организму, обладающему увеличенной биомассой по сравнению с нетрансгенным организмом. Изобретение позволяет эффективно увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма. 6 н. и 6 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

WO2004035798 A2, 29.04.2004. WO2010046221 A1, 29.04.2010. PAKULA AA et al., Genetic analysis of protein stability and function, Anna. Rev. Genet., 1989, vol.23, pp.289-310.RU 2241753 C2, 10.12.2004.

RU 2 581 945 C2

RU 2 581 945 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01H 3/04 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012156243/10, 24.05.2011**

(24) Effective date for property rights:
24.05.2011

Priority:

(30) Convention priority:
25.05.2010 EP 10382143.5

(43) Application published: **27.06.2014** Bull. № 18

(45) Date of publication: **20.04.2016** Bull. № 11

(85) Commencement of national phase: **25.12.2012**

(86) PCT application:
EP 2011/058464 (24.05.2011)

(87) PCT publication:
WO 2011/147826 (01.12.2011)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**MARTINES RAMIRES Alfredo (ES),
ARENAS VIDAL KHorkhe Konrado (ES)**

(73) Proprietor(s):

BAJOMASS BUSTER, S.L. (ES)

(54) **METHOD FOR INCREASING PLANT BIOMASS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method for increasing biomass of photosynthetic organisms which comprises culturing of said photosynthetic organism using peptide. Also disclosed is a gene construct for increasing the biomass of photosynthetic organisms, as well as a vector comprising it. Invention also relates to

a cell for increasing biomass of photosynthetic organisms as well as to the body having increased biomass compared to non-transgenic organism.

EFFECT: effective increase of photosynthetic organism biomass.

12 cl, 2 dwg, 2 ex

C 2
5
4
6
1
9
4
5
R U

R U
2 5 8 1 9 4 5
C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, в частности к производству растительной биомассы. Настоящее изобретение, таким образом, относится к применению пептида, включающего шестичленное кольцо, образованное дисульфидной связью между двумя цистеинами, в увеличении биомассы растения, что находит применение в деревообрабатывающей промышленности, при получении энергии из возобновляемых источников и в сельском хозяйстве.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рост клеток как у растений, так и у животных управляется рядом внеклеточных сигналов, известных как гормоны или факторы роста (Galinha et al., 2009, *Semin Cell Dev Biol.* 20:1149-1156), которые действуют через специфичные мембранные рецепторы (Santner and Estelle 2009, *Nature* 459:1071-1078; De, I et al. 2009, *Nat Cell Biol* 11:1166-1173). Гормоны могут синтезироваться в растениях или могут поступать из других организмов, как в случае факторов, продуцируемых ризобактериями, которые способствуют росту своего растения-симбионта (Lugtenberg and Kamilova 2009, *Annu Rev Microbiol* 63:541-556).

Существует пять групп факторов роста растений: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и ее производные и этилен. Указанные вещества широко распространены и могут, фактически, быть обнаружены у всех высших растений. Они являются специфичными в отношении своего действия, активными при очень низких концентрациях и регулируют рост клеток, деление клеток и дифференцировку, а также органогенез, старение и латентное состояние. Менее распространено, хотя не является совершенно неизвестным, явление, при котором сохранение структуры фактора роста происходит таким образом, что указанный фактор роста является функциональным как в растениях, так и в животных. Типичным примером является гликопротеин, известный как гранулин, который имеет представителей от грибов до млекопитающих и выполняет такие различные функции, как модуляцию вегетативного роста у овощей или регуляцию рака у животных (Bateman and Bennett 2009, *Bioessays* 31:1245-1254).

С целью регуляции развития растений и увеличения растительной биомассы было сделано множество попыток управлять их ростом посредством применения химических соединений, таких как, например, описанные в заявке на патент EP 0934951 A1 или удобрения. В заявке на патент US 2010/0016166 A1 описан способ увеличения количества семян и цветков растения, который включает культивирование растения в присутствии глутамата. В заявке на международный патент WO 2010/001184 A1 описана композиция, включающая (i) микронизированный природный минерал кальцит; (ii) микронизированный цеолит и (iii) одну или более добавок для стимуляции роста растения и повышения урожайности. Впрочем, применение минеральных удобрений оказывает отрицательное влияние на сельскохозяйственное производство, поскольку высокие концентрации удобрения могут повреждать почву, и не всегда достигается требуемая урожайность.

В последние годы и благодаря успехам в генной инженерии была создана новая стратегия увеличения биомассы растений, состоящая из регуляции экспрессии определенных генов, которые управляют метаболизмом растительной клетки. В этом отношении в заявке на патент США US 2009/0094716 A1 описан способ увеличения биомассы растения, включающий манипуляцию экспрессией гена *fve*, кодирующего белок (FVE), содержащий 6 копий домена WD40. Ингибирование экспрессии FVE приводит к растению с улучшенными сельскохозяйственными свойствами, в частности увеличенным выходом биомассы, производимой растением, по сравнению с

контрольным растением. Кроме того, в заявке на международный патент WO 2007/027866 описано применение рекомбинантной ДНК для экспрессии белков, применимых в контроле морфологии, физиологии и роста растения. Указанная рекомбинантная ДНК включает функциональный в растениях промотор, ковалентно связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, который содержит по меньшей мере один домен белков семейства Pfam. В заявке на патент WO 2009/003429 A2 описан способ регуляции продукции биомассы в растениях, включающий модификацию экспрессии гена *skil* или его ортологов или гомологов. В заявке на патент США US 2010/0037351 A1 описано увеличение биомассы растения и вместе с тем урожайности растения в условиях гиперосмотического стресса посредством оверэкспрессии в растениях гена, кодирующего фосфолипазу *De (PLDe)*. Впрочем, способы, включающие генетическую модификацию растения, обычно дороги и не принимаются обществом.

В заявке на международный патент WO 2004/035798 раскрыта идентификация генов, экспрессия которых повышается или понижается в трансгенных растениях, оверэкспрессирующих *E2Fa/DPa*, и их применение для изменения характеристик растения; в частности раскрыт белок SEQ ID NO: 1848, хотя его возможное применение в качестве фактора роста растений не показано.

Кроме того, в заявке на международный патент WO 2004/035798 раскрыт, в общем, способ получения растения с увеличенной урожайностью по сравнению с соответствующим растением дикого типа, включающий, по меньшей мере, повышение активностей группы белков, включающей белки SEQ ID NO: 4659 и 4660, хотя способность указанных белков увеличивать биомассу растений не раскрыта.

Таким образом, в уровне техники существует потребность в создании способов увеличения биомассы растения, альтернативных уже существующим, и, вместе с этим, урожайности, которые не имеют вышеуказанных недостатков.

Недавно было установлено, что введение адrenomедуллина в растения и водоросли увеличивает их биомассу. Адrenomедуллин (АМ) и пептид длиной 20 аминокислот N-концевой области проадrenomедуллина (РАМР) образуются в результате посттрансляционного процессинга одного и того же белка, препроадrenomедуллина, который кодируется геном *adm*. Несмотря на отсутствие некоторого структурного подобия, оба пептида производят подобные и многочисленные физиологические ответы. Среди них - сосудорасширяющее действие, бронхорасширяющее действие, эффект регуляции подвижности и роста клеток, эффект модуляции для секреции других гормонов и эффект регуляции кишечной абсорбции (Lopez, J and Martinez, A. 2002. *Int Rev Cytol* 221:1-92). В отношении раковых клеток АМ действует подобно фактору роста, повышает подвижность клеток, уменьшает апоптоз и вызывает ангиогенез (Martinez et al. 2002, *J Natl Cancer Inst* 94:1226-1237).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, неожиданно, введение адrenomедуллина в растения и водоросли (включая микроводоросли), в общем, "фотосинтезирующие организмы", вызывает в указанных организмах рост их биомассы, обнаруживая, таким образом, новое применение указанного белка в качестве фактора роста в растениях и водорослях.

Как показано в Примере 1, каллусы моркови и табака помещали в условия с увеличивающимися концентрациями адrenomедуллина и наблюдали, что по сравнению с контрольным образцом происходило увеличение роста каллусов в соответствии с дозозависимым ответом (Фигура 1). Кроме того, Пример 2 показывает, что микроводоросли (*Chlorella*), обработанные адrenomедуллином, растут быстрее, чем

необработанные микроводоросли.

Таким образом, на основании указанных открытий, настоящее изобретение позволяет увеличивать растительную биомассу растения или водоросли без необходимости в применении гормонов (гибереллинов, ауксинов, цитокининов и т.д.) или агрохимических продуктов. Кроме того, при условии, что это - фактор, не свойственный фотосинтезирующему организму (то есть он не вырабатывается растениями или водорослями в природе), он не будет производить побочных эффектов в отношении физиологии растения (движение сока, открытие устьиц, упругость, отношения с грибами-симбионтами и т.д.) или физиологии водоросли и влиять только на рост растения или водоросли, что является эффектом, который наблюдали. Дополнительно, тот факт, что он не вырабатывается в растениях или водорослях в естественных условиях, облегчает экологический контроль и контроль за распространением генетически модифицированного материала.

С другой стороны, известно, что адреномедуллин содержит характерный мотив (или идентифицирующий признак) в своей аминокислотной последовательности, который участвует в узнавании рецептора и состоит из кольца из 6 аминокислот, сформированного дисульфидной связью между двумя цистеинами [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys]. Таким образом, не желая быть связанными с какой-либо теорией, предполагается, что любой белок, содержащий указанный мотив в своей аминокислотной последовательности, будет узнавать рецептор и вызывать процессы, которые приводят к увеличению биомассы указанных фотосинтезирующих организмов (например, растений или водорослей), выполняя свою роль в качестве фактора роста.

Таким образом, на основании указанного нового эффекта адреномедуллина в отношении фотосинтезирующих организмов (например, растений и водорослей) и принимая во внимание мотив, присутствующий в его аминокислотной последовательности, были определены следующие аспекты изобретения:

- Способ увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, например растения или водоросли, который включает культивирование указанного фотосинтезирующего организма в присутствии пептида, включающего:

(i) аминокислотную последовательность
Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1],
где Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и
(ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), которые формируют дисульфидный мостик между ними.

- Генная конструкция, включающая:

(a) нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, который включает:

(i) аминокислотную последовательность
Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1],

где Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и

(ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), которые формируют дисульфидный мостик между ними, и

(b) регуляторные элементы для регуляции ее экспрессии в фотосинтезирующем организме.

- Вектор, клетка-хозяин, клетка трансгенного фотосинтезирующего организма и трансгенный фотосинтезирующий организм, например растение или водоросль, включающие генную конструкцию, такую как конструкция, определенная выше, или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, который включает: (i) аминокислотную

последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1], в которой Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и (ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), которые формируют дисульфидный мостик между ними.

Указанные аспекты изобретения, а также другие конкретные варианты его осуществления будут подробно обсуждаться ниже в подробном описании изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 представляет собой гистограмму, на которой показан относительный рост биомассы растения в зависимости от молярной концентрации адреномедуллина, присутствующего в среде. Каждый столбик представляет собой статистическое среднее и стандартное отклонение для 8 независимых повторов.

Фигура 2 представляет собой график, на котором показано действие адреномедуллина на микроводоросли (*Chlorella*); микроводоросли, обработанные адреномедуллином, растут быстрее, чем необработанные микроводоросли.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ изобретения

В одном аспекте изобретение относится к способу увеличения биомассы фотосинтезирующего организма (в дальнейшем называемого способом изобретения), который включает культивирование указанного фотосинтезирующего организма в присутствии пептида (в дальнейшем называемого фактором роста изобретения), включающего:

(i) аминокислотную последовательность
Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1],

где Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и

(ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), которые формируют дисульфидный мостик между ними.

Аминокислоты Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. В конкретном варианте осуществления Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и/или Хаа₄ являются аминокислотой, отличной от Cys.

Используемый в настоящей заявке термин "фотосинтезирующий организм" включает любой организм, способный осуществлять фотосинтез, то есть процесс, который превращает углекислый газ в органические соединения, в особенности сахара, с использованием энергии солнечного света. Фотосинтез происходит в растениях, водорослях и многих видах бактерий, например цианобактериях и т.д., но не в археях. Фотосинтезирующие организмы также называют фотоавтотрофами, так как они могут создавать свою собственную пищу.

Термин "растение", используемый в настоящей заявке, включает живые организмы, относящиеся к царству Растения, например деревья, цветы, травянистые растения, кустарники, травы, вьющиеся растения, папоротники, мхи, зеленые водоросли и т.д. В настоящее время растения могут быть разделены на три группы, а именно: (i) Наземные растения или эмбриофиты, более формально Embryophyta или Metaphyta, которые составляют самую известную группу растений и включают бессосудистые наземные растения или бриофиты (мохообразные), сосудистые растения или трахеофиты, которые включают семенные растения или сперматофиты; (ii) Зеленые растения, также известные как Viridiplantae, Viridiphyta или Chlorobiont, и (iii) Archaeplastida, Plastida или Primoplantae.

Используемый в настоящей заявке термин "водоросль" включает большую и разнообразную группу простых, как правило, автотрофных, организмов, от

одноклеточных до многоклеточных форм. В конкретном варианте осуществления водоросль является микроводорослью, то есть микроскопической водорослью, как правило, встречающейся в пресноводных и морских системах.

Используемый в настоящей заявке термин "цианобактерии", которые обычно называют сине-зелеными водорослями, хотя и относили традиционно к водорослям в более ранних учебниках, много современных источников считают это устаревшим, поскольку они, как теперь полагают, являются бактериями.

В рамках настоящего изобретения "биомасса фотосинтезирующего организма" понимается и как количество биологического материала или органического вещества, которое составляет фотосинтезирующий организм, и как биологический материал или органическое вещество, образующиеся в биологическом процессе, спонтанном или не спонтанном (то есть вызванном). В одном варианте осуществления биомасса может применяться в качестве источника энергии, например древесина, отходы, (водородосодержащий) газ, спиртовые топлива и т.д.

В одном варианте осуществления, в котором фотосинтезирующий организм является сосудистым растением, биомасса указанного растения включает количество биологического материала или органического вещества, присутствующего в растении, то есть биологический материал или органическое вещество, составляющее как надземную часть растения, то есть стебель, ствол, листья, ветви, плоды, соцветия и т.д. (надземная биомасса), так и его подземную часть, то есть корни, каллусы, клубни и т.д. (подземная биомасса). "Биомасса растения" часто измеряется как сухая масса или вес (или "сырой вес" в соответствующих случаях) растения.

В настоящем изобретении выражение "увеличение биомассы фотосинтезирующего организма" следует понимать как воздействие на фотосинтезирующий организм с получением скорости роста, превышающей 1, где скорость роста (GR) определяется формулой:

$$GR = \text{Конечный вес/начальный вес.}$$

Другой способ измерения увеличения биомассы фотосинтезирующего организма основан на вычислении относительной скорости роста (RGR) или прироста биомассы в расчете на единицу биомассы и время и определяется формулой:

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_1 - t_2),$$

в которой W_1 и W_2 представляют собой вес растения в моменты времени 2 и 1 ($t_2 - t_1$, соответственно) [Valladares, F. 2004, Ecologia del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, pp. 191-227. Ministerio de Medio Ambiente (Ministry of the Environment), EGRAF, S.A., Madrid].

Как сумеет оценить специалист, квалифицированный в данной области техники, в случае сосудистых растений в уровне техники существуют другие параметры, которые прямо или косвенно связаны с GR и могут применяться для определения роста растительной биомассы указанного растения. Иллюстративные, неограничивающие примеры указанных параметров включают:

- отношение площади листа (LAR) или отношение площади листа к полному весу растения. Ее выражают в м^2 (лист) кг^{-1} (растение). Площадь листа может быть измерена несколькими способами. Существуют автоматические устройства для измерения площади листа, которые снабжены видеокамерой, цифровой картой и компьютерной программой для анализа изображения, которые обеспечивают довольно быстрое выполнение измерений площади (в дополнение к другим измерениям: ширина, длина и т.д.) некоторого количества листьев. Другая система позволяет фотокопировать или сканировать листья и с помощью программы для анализа изображения оценивает

поверхность. Другая простая альтернатива состоит в вырезании силуэтов фотокопируемых листьев и их взвешивании с использованием вырезаемой по их контуру бумаги с известной площадью поверхности для калибровки соотношения веса/площади. После измерения площади поверхности листьев листья сохраняют в бумажных конвертах с их описанием, сушат в термостате и взвешивают, получая, таким образом, "сухой вес";

- удельную площадь листа (SLA) или отношение площади листа к весу листа. Ее выражают в м^2 (лист) кг^{-1} (растение);

- среднюю фракцию листьев (LMF) или отношение биомассы листьев к полной биомассе растения. Ее выражают в кг (лист) кг^{-1} (растение); или

- скорость истинной ассимиляции (NAR) или скорость увеличения веса растения на единицу площади листа. Ее выражают в кг (растение) м^{-2} (лист) день^{-1} . Относительная скорость роста равна произведению LAR и NAR.

Другие параметры анализа роста включают:

- фракцию массы стебля (SMF) или отношение биомассы стебля к полной биомассе растения. Ее выражают в кг (стебель) кг^{-1} (растение);

- фракцию массы корня (RMF) или отношение биомассы корня к полной биомассе растения. Ее выражают в кг (корень) кг^{-1} (растение); и

- сухое вещество (DM) или отношение сухого веса растения к сырому весу растения. Ее выражают в кг (сухой вес) кг^{-1} (сырой вес).

Способ согласно изобретению может быть применен к любому типу фотосинтезирующего организма, например растению, водоросли и т.д. Таким образом, согласно настоящему изобретению, при контакте фактически любого фотосинтезирующего организма с фактором роста изобретения получают увеличение биомассы указанного фотосинтезирующего организма.

Как указано в начале настоящего описания, фактор роста изобретения представляет собой пептид, включающий мотив [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys]. Впрочем, в конкретном варианте осуществления, фактор роста изобретения является пептидом, включающим мотив [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys], при условии, что указанный пептид не является пептидом SEQ ID NO: 4 или пептидом SEQ ID NO: 6.

Как сумеет оценить специалист, квалифицированный в данной области техники, указанный мотив, необязательно, будет фланкирован другими аминокислотными последовательностями, составляющими часть пептида, идентифицированного как фактор роста изобретения.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления указанный пептид (фактор роста изобретения) включает аминокислотную последовательность:

X_1 -Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys- X_2 ,

в которой:

- X_1 обозначает аминокислотную последовательность N-конца пептида, и

- X_2 обозначает аминокислотную последовательность C-конца пептида.

Используемый в настоящем описании термин "пептид" относится к молекуле, сформированной при связывании аминокислот посредством пептидных связей, и он включает, в целях упрощения, пептиды, полипептиды и белки, хотя обычно принято, что термин "белок" применяют к полным биологическим молекулам со стабильной конформацией, тогда как термин "пептид" обычно относится к аминокислотным

олигомерам с короткой цепью, которые часто не имеют стабильной трехмерной структуры; аналогичным образом, термин "полипептид" обычно относится к любой боковой цепи аминокислот, независимо от их длины (в большинстве случаев), которая часто не имеет определенной конформации.

5 Хотя длина аминокислотной последовательности N-концевого пептида (X_1) может изменяться в пределах широкого диапазона, в конкретном варианте осуществления X_1 имеет длину в пределах от 1 до 250 аминокислот, или еще более типично в пределах от 1 до 175 аминокислот, обычно в пределах от 1 до 100 аминокислот, чаще в пределах от 1 до 50 аминокислот, еще чаще в пределах от 2 до 40 аминокислот и даже еще чаще
10 в пределах от 5 до 35 аминокислот.

Аналогичным образом, хотя длина аминокислотной последовательности C-конца (или карбоксильного конца) пептида (X_2) может изменяться в пределах широкого диапазона, в конкретном варианте осуществления X_2 имеет длину в пределах от 1 до
15 250 аминокислот или еще более типично в пределах от 1 до 175 аминокислот, обычно в пределах от 1 до 100 аминокислот, чаще в пределах от 1 до 50 аминокислот, еще чаще в пределах от 2 до 40 аминокислот.

В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность C-конца пептида (X_2) включает аминокислотную последовательность GRRRR (SEQ ID NO: 7),
20 которая, в другом конкретном варианте осуществления, расположена на расстоянии 10-50 аминокислот от последнего Cys последовательности Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys, то есть между последней аминокислотой (Cys) указанной последовательности и первой аминокислотой (G) последовательности GRRRR (SEQ ID NO: 7) присутствует от 10 до 50 аминокислот.

25 В конкретном варианте осуществления C-конец X_2 амидирован.

Иллюстративные примеры пептидов, включающих указанный мотив [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys], включают, помимо прочего, адrenomедуллин, белки Arabidopsis, аминокислотные последовательности которых показаны в
30 последовательностях SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, белки *Oryza sativa* (рис), аминокислотные последовательности которых показаны в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, и белок *Thalassiosira pseudonana* (диатомовая водоросль), аминокислотная последовательность которого показана в последовательности SEQ ID NO: 11.

35 Таким образом, в конкретном варианте осуществления способа изобретения фактор роста изобретения выбран из группы, состоящей из адrenomедуллина, пептидов, аминокислотные последовательности которых показаны в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и их комбинаций, которые будут подробно описаны ниже.

40 Адrenomедуллин

Адrenomедуллин (AM) представляет собой гипотензивный пептид, первоначально обнаруженный в феохромоцитоме человека, который состоит из 52 аминокислот, имеет внутримолекулярный дисульфидный мостик [Cys-Cys] и обладает высокой гомологией с пептидом, связанным с геном кальцитонина. Белок-предшественник,
45 препроадrenomедуллин (SEQ ID NO: 2) имеет длину 185 аминокислот (номер GenBank AAC60642.1), который в результате внутриклеточного процессинга приводит к образованию зрелого белка, содержащего 52 аминокислоты, который и является адrenomедуллином. В конкретном варианте осуществления способа изобретения AM

является адреномедуллином человека, определенным в SEQ ID NO: 3. Не желая быть связанными с какой-либо теорией, предполагается, что факт наличия активности АМ человека в тканях растений обусловлен существованием подобного фактора в растениях или в микроорганизмах, связанных с ними.

5 SEQ ID NO: 2 (препроадреномедуллин)

MKLVSVALMY LGSLAFLGAD TARLDVASEF RKKWKNWALS RGKRELRMSS

SYPTGLADV K AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RVKRYRQSMN

10 NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL ANQIYQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYGRRR

RRSLPEAGPG RTLVS SKPQA HGAPAPPSGS APHFL

15 [Аминокислотная последовательность адреномедуллина подчеркнута, а аминокислотная последовательность мотива GRRRR подчеркнута двойной линией и выделена жирным шрифтом]

SEQ ID NO: 3 (человеческий адреномедуллин)

YRQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL ANQIYQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGY-NH₂

20 [Характеристический мотив адреномедуллина (Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys) выделен жирным шрифтом, при этом два цистеина, формирующие дисульфидный мостик, подчеркнуты]

25 Как будет очевидно специалисту, квалифицированному в данной области техники, любой вариант SEQ ID NO: 3, обладающий способностью увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма, также включен в настоящее изобретение.

Используемый в настоящем описании термин "вариант SEQ ID NO: 3" относится к любому пептиду, аминокислотная последовательность которого может быть получена из SEQ ID NO: 3 посредством консервативных аминокислотных замен с проверкой того, что полученный в результате вариант обладает способностью увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма с помощью измерения любого из указанных выше параметров. Консервативные аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, состоит из глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина; группа аминокислот, имеющих алифатические, гидроксильные боковые цепи, состоит из серина и треонина; группа аминокислот, имеющих боковые цепи, содержащие амидную группу, состоит из аспарагина и глутамина; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, состоит из фенилаланина, тирозина и триптофана; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, состоит из лизина, аргинина и гистидина; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, состоит из цистеина и метионина. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен являются следующими: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

45 Функционально эквивалентные варианты адреномедуллина включают полипептиды, которые являются по существу гомологичными нативному адреномедуллину [SEQ ID NO: 3]. Используемое в настоящем описании выражение "по существу гомологичный" относится к любой аминокислотной последовательности, обладающей степенью идентичности по отношению к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 50%, преимущественно по меньшей мере 60%,

предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 85% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95%. Степень идентичности между двумя пептидами может быть определена при использовании компьютерных алгоритмов и методов, которые широко известны специалистам, квалифицированным в данной области. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями двух пептидов предпочтительно определяют при использовании алгоритма BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).

С другой стороны, адреномедуллин содержит в своей аминокислотной последовательности характеристический мотив (или идентифицирующий признак), который участвует в узнавании рецептора адреномедуллина и состоит из кольца из 6 аминокислот, сформированного дисульфидной связью между двумя цистеинами [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys]. Адреномедуллин дополнительно имеет амидированный С-конец (CONH₂), отделенный от мотива примерно 20-40 аминокислотами. Любой вариант адреномедуллина, содержащий мотив Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys в своей аминокислотной последовательности, будет узнавать рецептор адреномедуллина и вызывать процессы, которые приводят к увеличению биомассы фотосинтезирующего организма. Таким образом, настоящее изобретение также рассматривает такие варианты адреномедуллина, которые обладают способностью увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма и включают указанное кольцо из 6 аминокислот, сформированное дисульфидной связью между двумя цистеинами. Варианты SEQ ID NO: 3 могут дополнительно иметь амидированный С-конец.

В заключение, фрагменты адреномедуллина или его варианты, как определено выше, также включены в настоящее изобретение при условии, что они сохраняют способность увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма. Указанная способность может быть определена с помощью параметров, указанных в предыдущих параграфах.

Белки Arabidopsis

Другие конкретные варианты осуществления фактора роста изобретения включают белки Arabidopsis, описанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

Белок, идентифицированный согласно последовательности SEQ ID NO: 4 [MLDTLIGGIVGGIAGAIGTVDGFARGIGICPDSYQSCTRTDCEENKKKLPTNLSRNGG
 5 AAVKAKENGRRRRQKPRE-NH₂], является белком с неизвестным названием под номером GenBank NP_564910.

Белок, идентифицированный согласно последовательности SEQ ID NO: 5 [MDPKSCENSSDVKGQTSDSVSKKVLIEEEEDVKKPQQGKENDSRMAKDWSCSSNISA
 10 HVVHEEVADNVTAVSCNEAESDIKAKAKEFHITIDLSGVGERICRICHFSGSDQSPEASGDDKSVS
 PELIEIGCKCKNELGLANFHCAEAWFKLRGNSVCEICGCTAKNVTVRLMEDWSGERDNTLDGRR
 15 RRGRGQSCCIFMVFLLLTILLLHWFFKKISGYQNT-NH₂], является белком семейства белков с цинковыми пальцами (RING палец СЗНС4-типа) под номером GenBank NP_180967.

Белок, идентифицированный согласно последовательности SEQ ID NO: 6 [MGDVILFIDDTKSKVRITRCRICHEEEEEESFFEVPACASGTVKFAHRNCIQRCWNEK
 20 GNTTCEICLQVYKGYTAVLKOSKLIQEVTIRVNGRRRRRRSRRLVSIAESDISOCNSVADRG
 25 SFCRSLTFTLSVFLMKHTFDVIYGTEEYPFVFTVLTLLKAIGILLPMFIIIRTISTIQKTLRR
 RHQYPESEEEEDRLSSDDDDDL EEED EEQQH LA-NH₂], является белком, называемым pitchoun 1 (PIT1), с номером GenBank NP_567222.

[Во всех случаях характеристический мотив фактора роста изобретения (Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys) выделен жирным шрифтом, два цистеина, формирующие дисульфидный мостик, подчеркнуты, и аминокислотная последовательность мотива **GRRRR** подчеркнута двойной линией и выделена жирным шрифтом]

35 Как сумеет оценить специалист, квалифицированный в данной области, варианты и фрагменты указанных белков также включены в рамки настоящего изобретения при условии, что они сохраняют характеристический мотив фактора роста изобретения и при введении в фотосинтезирующий организм увеличивают его биомассу. Увеличение биомассы фотосинтезирующего организма может быть установлено посредством
 40 любого из указанных выше параметров, например с помощью анализа увеличения биомассы растения, такого как анализ, описанный в Примере 1, или с помощью анализа увеличения биомассы водоросли, такого как анализ, описанный в Примере 2. Термин вариант и его значение в рамках настоящего изобретения были определены в предыдущих параграфах.

45 Белки *Oryza sativa*

Пептиды, включающие мотив [Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys], включают, без ограничения, белки *Oryza sativa* (рис), аминокислотные последовательности которых показаны в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 8:MEAAPRDDKPARMNS~~EDDD~~GHRRWGS~~DGGE~~AMPRTTSPVRRCDAGGGGGVADSAWEEEGP

5 TGEIPARRMERPARHGGVPAKYGRRLDGEDDGVLPGEWATSASAQETRQRRPEAEQWRQRHCC
 RRGCTSGGVRGKRRAGRGRGGDYDAGGGDGTAGRRADAAAGVAGFGRRRRRERRRSATVWLGRSG
 RGKTEGEVD*

10 SEQ ID NO: 9 (белок-предшественник рецепторной протеинкиназы
 2, предполагаемый, экспрессируемый):

MHAACL~~C~~STCC~~SC~~RPRCAARRPRRARRRRCSRGRTPCRARRRRRPPASSGRGRRRRRSSRT

15 RTPRRGARGAAWRRRVGRRGGRRRGAGVAGTLDALDLSSLPGLAALNLSLNSLTGSFPSNVSS
 PLLSLRSIDLSSNNLSGPIPAALPALMPNLEHLNLSNQSFSGEIPASLAKLTKLQSVVLGSNLL
 HGGVPPVIGNISGLR~~TLE~~LSGNPLGGAIPTTLGKLSLEHINVSLAGLESTIPDEL~~SL~~CANLTV
 20 IGLAGNKLTGKLPVALARLTRVREFNVSKNMLSGEVLPDYFTAWTNLEVFQADGNRFTGEIPTA
 ITMASRLEFLSLATNNLSGAI PPVIGTLANLKL~~LD~~LAENKLAGAIPRTIGNLTSLET~~LR~~LYTNK
 25 LTGRLPDELGDMAALQRLSVSSNMLEGELPAGLARLPRLVGLVAFDNL~~LS~~GAI PPEFGRNGQLS
 IVSMANNRFSGELPRGVCASAPRLRWLGLDDNQFSGTVPACYRNL~~TN~~LVRLRMARNKLAGDVSE

30

35

40

45

ILASHPDLYYLDLSGNSFDGELPEHWAQFKSLSFLHLSGNKIAGAI PASYGAMSLQDLDLSSNR
 LAGEIPPELGSPLTKLNLRRNALSGRVPATLGNAARMEMLDLSGNALDGGVPVELTKLAEMWY
 5 LNLSSNNLSGEVPPLLGKMRSLTTLDLSGNPGLCGHDIAGLNSCSSNTTTGDGHSGKTRLVLAV
 TLSVAAALLVSMVAVVCAVSRKARRAAWVEKAETSASGGGGSSTAAAVQASIWSKDTTFSFGDI
 LAATEHFNDAYCIGKGSFGTVYRADLGGGRAVAVKRLDASETGDACWGVSEERSFENEVRALTRV
 10 RHRNIVKLHGFCAMGGMYLVYELAERGS LGAVLYGGGGGGGCRFDWPARMRAIRGVAHALAYL
 HHDCSPPMIHRDVSNNVLLDPDYEPRVSDFGTARFLVPGRSTCDSIAGSYGYMAPELAYMRVT
 TKCDVYSFGWAMEMLMGKYPGGLISSLQHSPQSLSAEGHDGSGGGGGEEASASASRRLLLKDVV
 15 DQRLDAPAGKLAGQWFAFVVALSCVRTSPDARPTMRAVAQELAARRRPILDRPFEMIKIGDLTN
 SHR*

SEQ ID NO: 10:

20 MSRRGTRRQRDNGDRGAASSSSPSTSPSHGPAGGWASQIRCCGAWCGGRTSVAVMLGDG
 APVLLGRRRRRPPSSLLLMLFFFFFFFHVQNACMPCSLAC*

[Во всех случаях характеристический мотив фактора роста изобретения (Cys-
 25 Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys) выделен жирным шрифтом, два цистеина, формирующие
 дисульфидный мостик, подчеркнуты, и аминокислотная последовательность мотива
 GRRRR подчеркнута двойной линией и выделена жирным шрифтом]

Белок *Thalassiosira pseudonana* (диатомовая водоросль)

SEQ ID NO: 11:

30 MAPALCGDLISTRRSFLALAWTLTLLSFFSFWAVFLAGRINQQYISMTSGDYAEWYTHE
 YGNDFYDRLLLEEGSGECCRYLEGGEEGGGGEQQREGEDHDRQEGGSNDRNQLDAEFFQSLANAN
 35 SRSLEFAGVYTTVLGIALSLYGSTVWGFMSLKGEYIIPCF SFRSMSEEEGEVGVEDADTGPR
 NLWGEKIHrgvFLGCLVIFANLLLLCAVIFGELEVHDNYNNYDQQNNDNIFSYRIEKISSVFAI
 TCIVLACVYVLFVAVIYLS CGGMLDDDNDTVQHNTGNWMDHSHSOFELSPRGNRRRRRGRRDMPD
 40 KAEPLVSAVGGGITEIGCATRSDERAYVLDEGCIDETT*

[Характеристический мотив фактора роста изобретения (Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys)
 выделен жирным шрифтом, два цистеина, формирующие дисульфидный мостик,
 подчеркнуты, и аминокислотная последовательность мотива GRRRR подчеркнута
 45 двойной линией и выделена жирным шрифтом]

Для того чтобы фактор роста изобретения производил требуемый эффект, то есть
 увеличивал биомассу фотосинтезирующего организма, необходим контакт указанного
 фактора роста с указанным фотосинтезирующим организмом. В уровне техники

существует множество процессов, которые позволяют вводить активные компоненты (в настоящем изобретении фактор роста изобретения) в фотосинтезирующий организм, в особенности растения. Аналогичным образом, активный компонент включают в композицию таким способом, который подходит для применяемого способа введения.

5 Обычно для его введения в фотосинтезирующий организм фактор роста изобретения будет частью композиции, которую можно применять в твердой форме или в жидкой форме, например в форме смачиваемого порошка или эмульгируемого концентрата, включающего стандартные разбавители. Указанные композиции могут быть получены стандартным способом, например при смешивании фактора роста изобретения с
10 разбавителем и, необязательно, с другими компонентами или элементами. В конкретном варианте осуществления фотосинтезирующий организм является растением, и при этом композиция, включающая фактор роста изобретения, может быть получена стандартными способами, путем смешивания фактора роста изобретения с разбавителем и, необязательно, с другими компонентами или элементами, которые обычно
15 применяются в сельскохозяйственных композициях и которые известны специалисту, квалифицированному в данной области техники, такими как, помимо прочего, растворители, активные вещества или регуляторы pH, удобрения и т.д. В конкретном варианте осуществления фактор роста изобретения вводят в качестве добавки, дополняющей питательный раствор, поступающий растению в гидропонной системе,
20 или, в другом конкретном варианте осуществления, его вводят в поливную воду указанного растения.

Концентрация фактора роста изобретения в композиции может изменяться в пределах широкого диапазона, как правило, от по меньшей мере 10^{-2} до 10^{-16} М, обычно от по
25 меньшей мере 10^{-4} до 10^{-12} М, чаще от по меньшей мере 10^{-6} до 10^{-11} М, еще чаще от по меньшей мере 10^{-8} до 10^{-10} М. Дополнительными техническими особенностями указанной композиции являются, например, сельскохозяйственно приемлемые носители, которые могут использоваться, дополнительные компоненты, которые могут быть включены, форма ее представления, способ ее получения и т.д.

30 В смысле, используемом в настоящем описании, термин "сельскохозяйственно приемлемый носитель" включает любое вещество или комбинацию веществ, которые могут применяться в сельскохозяйственном секторе, при этом он включает любой сельскохозяйственно приемлемый жидкий или твердый материал, который может быть добавлен к и/или смешан с фактором роста изобретения для получения более простой
35 или улучшенной в применении формы, или с применимой или требуемой интенсивностью активации.

Композиция, описанная в настоящей заявке, также может содержать, при необходимости, другие компоненты или элементы, обычно используемые в сельскохозяйственных композициях, такие как, без ограничения, растворители, активные
40 вещества или регуляторы pH, удобрения и т.д., если все они позволяют, или не подвергают риску, или не нарушают способность фактора роста изобретения увеличивать растительную биомассу растения. Указанные компоненты или элементы, обычно используемые в сельскохозяйственных композициях, общеизвестны специалистам, квалифицированными в данной области техники.

45 Композиция, предложенная в настоящем изобретении, может быть получена стандартными способами, обычно основанными на смеси различных компонентов композиции в подходящих количествах.

Как указано выше, способ изобретения может применяться на любом

фотосинтезирующем организме. В конкретном варианте осуществления способ изобретения применяют к таким фотосинтезирующим организмам, в которых увеличение биомассы является особенно желательным, таким как, например, растения и водоросли, которые могут в промышленном масштабе применяться в любой отрасли промышленности. Таким образом, в конкретном варианте осуществления фотосинтезирующий организм является растением, например растением для применения в производстве энергии, например возобновляемых источников энергии, для питания человека или животных, пород древесины, декоративных растений и т.д.

Примеры растений, биомасса которых используется в производстве топлив или возобновляемых источников энергии, включают, без ограничения:

(i) растения для применения в производстве электроэнергии, получаемой главным образом из быстрорастущих пород деревьев для получения энергии, таких как тополь, ива, эвкалипт, белая акация, хвойные деревья, акация, банановое дерево и т.д., а также травянистых растений, таких как чертополох, мискантус, гигантский тростник, молочай, опунция и т.д.; и

(ii) растения для применения в производстве биотоплива: производство биоспиртов, получаемых из свеклы, кукурузы, сладкого сорго, сахарной свеклы, картофеля, топинамбура и т.д., и биомасел, получаемых из семян рапса, подсолнечника, сои и т.д.

Как будет очевидно специалисту, квалифицированному в данной области техники, также растительную биомассу можно применять для получения тепловой энергии и в производстве топливных газов. Впрочем, из-за особенностей указанных процессов (тепловая энергия состоит из применения систем прямого сгорания для получения тепла, а производство топливных газов состоит из разрушения биомассы в метантанке с получением газа), биомасса, применяемая в производстве указанной энергии, может быть получена из любого растения.

Примеры древесных растений включают, помимо прочего, сосну, эвкалипт, пробковый дуб, кедр, дуб, дуб падуболистный и т.д.

Иллюстративные неограничивающие примеры представляющих интерес декоративных растений включают растения, относящиеся к роду *Aeschynanthus*; *Carina*; *Columnea*; *Anemone*; *Azalea*; *Begonia*; *Calceolaria*; *Camelia*; *Dianthus*; *Freesia*; *Gerbera*; *Hibiscus*; *Hypoestes*; *Kalanchoe*; *Nicotiana*; *Pelargonium*; *Petunia*; *Primula*; *Ranunculus*; *Rhipsalidopsis*; *Rosa*; *Saintpaulia*; *Sinningia-gloxinia*; *Streptocarpus*; *Tigridia*; *Verbena* или *Zinnia*. Другие декоративные растения включают орхидеи (семейство *Orchidaceae*) и декоративные кустарники, которые включают лавр благородный (*Laurus nobilis*), жимолость (*Lonicera fragrantissima*), магнолию звездчатую (*Magnolia stellata*), гортензию крупнолистную (*Hydrangea macrophylla*), бобовник (*Laburnum x watereri*), японскую розу или керрию (*Kerria japonica*) и т.д.

Иллюстративные неограничивающие примеры растений, применяемых для питания человека или животных, включают плодовые деревья, которые включают, помимо прочих, вишню, сливу, персик, абрикос, оливковое дерево, манго, грушу, яблоню, мушмулу японскую, айву, апельсин, лимон, инжир, папайю, каштан, дуб, дуб падуболистный, дуб кермесовый, лесной орех, миндаль, грецкий орех и т.д.; кормовые растения, которые включают, помимо прочих, бобовые (например, клевер, люцерну, клитории, арахис, леуцену, колокольчики и т.д.), травы (например, рожь, овсяницу, ежу сборную, бутелуа изящную, родсову траву, буйволиную траву, бородачи, ветвянки, бермудскую траву, которая считается газонной травой, и слоновую траву или щетинник, сахарную свеклу, арундо тайваньскую и метлицу полевую, которые являются фуражными, и т.д.), зерновые (например, сорго, пшеницу, рожь, ячмень и т.д.); растения

для употребления человеком (салат, капуста, шпинат, швейцарский мангольд, зеленые бобы, томаты и т.д.) и т.д.

В другом конкретном варианте осуществления фотосинтезирующий организм является водорослью, например микроводорослью, такой как микроводоросли рода *Chlorella*, *Botryococcus*, *Nannochloropsis*, *Haematococcus*, *Neochloris* или *Tetraselmis*; другие иллюстративные, неограничивающие примеры водорослей в рамках настоящего изобретения включают аонори (*Enteromorpha intestinalis*) (несколько видов зеленой водоросли Моностромы) (Япония), араме (*Eisenia bicyclis*), алярию съедобную (*Alaria esculenta*), каролу (*Callophyllis variegata*) (Южная Америка), ирландский мох (*Mastocarpus stellatus*), хлореллу, ламинарию сахаристую, дурвиллею антарктическую, *Palmaria palmata*, *Euchema cottonii*, *Caulerpa lentillifera*, грацилярию, грацилярию конферовидную (*Agardhiella tenera*), хиджики или хизики (*Sargassum fusiforme*), хондавапа (*Sargassum enerve*), *Chondrus crispus*, *Porphyra laciniata*/*Porphyra umbilicalis*, *Ulva lactuca*, *Sargassum echinocarpum*, *Saccharina japonica*, миру (*Codium* sp.), мозуки (*Cladosiphon okamuranus*), нори (несколько видов красной водоросли *Porphyra*), ламинарию пальчаторассеченную (*Laminaria digitata*), огонори (несколько видов красной водоросли *Gracilaria*), *Fucus vesiculosus*, непеоцистис Лютке (*Nereocystis luetkeana*), порфиру лопатную (*Porphyra purpurea*, syn. *Porphyra laciniata*), *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima*, морской ремешок (*Himanthalia elongata*), цуномато (несколько видов красной водоросли *Chondrus*), вакаме (*Undaria pinnatifida*) и т.д.

Генная конструкция изобретения

Другая, рассматриваемая в соответствии с настоящим изобретением возможность достижения того, что фактор роста изобретения увеличивает биомассу фотосинтезирующего организма, состоит во вставке в геном указанного фотосинтезирующего организма нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный фактор роста, при этом, когда указанная нуклеотидная последовательность экспрессируется, это производит требуемый эффект в фотосинтезирующем организме.

Таким образом, в другом аспекте изобретение относится к генной конструкции, в дальнейшем генной конструкции изобретения, включающей:

(а) нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, который включает

(i) аминокислотную последовательность

Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1],

в которой

- Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и

(ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i),

формируют дисульфидный мостик между ними, и

(b) регуляторные элементы для регуляции ее экспрессии в фотосинтезирующем организме.

В конкретном варианте осуществления указанные регуляторные элементы подходят для регуляции экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный пептид в водоросли; указанные элементы известны квалифицированным специалистам.

В другом конкретном варианте осуществления указанные регуляторные элементы подходят для регуляции экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный пептид в растении; указанные элементы также известны квалифицированным специалистам.

В конкретном варианте осуществления регуляторные элементы для регуляции экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный пептид,

являются гетерологичными по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты, то есть, когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок *Arabidopsis* (например, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6), указанная последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в растении, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанных белков *Arabidopsis* в указанном растении в природе, или когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок *Oryza sativa* (например, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10), указанная последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в растении, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанных белков *Oryza sativa* в указанном растении в природе; или когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует *Thalassiosira pseudonana* (например, SEQ ID NO: 11), указанная последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в водоросли, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанного белка *Thalassiosira* в указанной водоросли в природе.

Аминокислоты Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. В конкретном варианте осуществления Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и/или Хаа₄ являются аминокислотой, отличной от Cys.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления указанная генная конструкция изобретения включает:

- (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, который включает
 - (i) аминокислотную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1], в которой - Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и
 - (ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), формируют дисульфидный мостик между ними, и

- (b) регуляторные элементы для регуляции ее экспрессии в фотосинтезирующем организме,

с условием, что, когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из белков, аминокислотные последовательности которых показаны в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) находится под контролем регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в растении, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанных белков в *Arabidopsis* sp. в природе;

с условием, что, когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из белков, аминокислотные последовательности которых показаны в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) находится под контролем регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в растении, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанных белков в *Oryza sativa* sp. в природе; и

с условием, что, когда указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) кодирует белок, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 11, указанная последовательность нуклеиновой кислоты (a) находится под контролем

регуляторных элементов для регуляции ее экспрессии в водоросли, отличных от регуляторных элементов, которые регулируют экспрессию указанных белков в *Thalassiosira pseudonana* (диатомовой водоросли) в природе.

В конкретном варианте осуществления генной конструкции изобретения указанный пептид включает аминокислотную последовательность

X_1 -Cys- X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} -Cys- X_2 ,

в которой:

- X_1 обозначает аминокислотную последовательность N-конца пептида, и

- X_2 обозначает аминокислотную последовательность C-конца пептида.

Хотя длина аминокислотной последовательности N-конца пептида (X_1) может изменяться в пределах широкого диапазона, в конкретном варианте осуществления X_1 имеет длину в пределах от 1 до 250 аминокислот, или еще более типично в пределах от 1 до 175 аминокислот, обычно в пределах от 1 до 100 аминокислот, чаще в пределах от 1 до 50 аминокислот, еще чаще в пределах от 2 до 40 аминокислот и еще чаще в пределах от 5 до 35 аминокислот.

Аналогичным образом, хотя длина аминокислотной последовательности C-конца пептида (X_2) может изменяться в пределах широкого диапазона, в конкретном варианте осуществления X_2 имеет длину в пределах от 1 до 250 аминокислот или еще более типично в пределах от 1 до 175 аминокислот, обычно в пределах от 1 до 100 аминокислот, чаще в пределах от 1 до 50 аминокислот, еще чаще в пределах от 2 до 40 аминокислот.

В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность C-конца пептида (X_2) включает аминокислотную последовательность GRRRR (SEQ ID NO: 7), которая, в другом конкретном варианте осуществления, расположена на расстоянии 10-50 аминокислот от последнего Cys последовательности Cys- X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} -Cys.

В конкретном варианте осуществления C-конец X_2 амидирован.

В другом конкретном варианте осуществления указанный пептид выбран из группы, состоящей из адrenomедуллина и белков, аминокислотные последовательности которых показаны в последовательностях SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, а также их функционально эквивалентных вариантах и фрагментах.

Генная конструкция изобретения может быть получена при использовании методов, известных из уровня техники [Sambrock et al., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol.1-3]. Указанная генная конструкция изобретения включает в себя функционально связанные с ней регуляторные элементы для регуляции ее экспрессии в фотосинтезирующем организме. Используемое в настоящем описании выражение "функционально связанные" означает, что нуклеиновая кислота, кодирующая фактор роста изобретения [то есть пептид, включающий аминокислотную последовательность Cys- X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} -Cys], экспрессируется в правильной рамке считывания под контролем регуляторных контрольных элементов или регулирующих экспрессию последовательностей. Контрольные регуляторные элементы представляют собой последовательности, которые контролируют и регулируют транскрипцию и, в соответствующих случаях, трансляцию белка, и включают промоторные последовательности, последовательности, кодирующие регуляторы транскрипции, последовательности связывания рибосомы (RBS) и/или последовательности терминации транскрипции.

Генная конструкция изобретения может быть встроена в геном клетки фотосинтезирующего организма, например клетку растения или ткань, или клетку водоросли, любым подходящим способом с получением трансформированных фотосинтезирующих организмов. Указанные способы могут включать, например, применение липосом, электропорации, диффузии, бомбардировки частицами, микроинъекции, генных пушек, химических соединений, которые увеличивают поглощение свободной ДНК, например преципитацию с фосфатом кальция, вирусные векторы и т.д.

Таким образом, в другом аспекте изобретение относится к вектору, включающему генную конструкцию изобретения.

В конкретном варианте осуществления указанный вектор является вектором, подходящим для трансформации водорослей; указанные векторы известны специалисту, квалифицированному в данной области (например, в WO 2009149470 раскрыты способы и композиции для трансформированных вектором клеток водорослей, где вектор включает в себя ψ_{sp} промотор, управляющий экспрессией гена устойчивости к антибиотику в клетке водоросли.

В другом конкретном варианте осуществления указанный вектор является вектором, подходящим для трансформации растений; указанные векторы также известны специалисту, квалифицированному в данной области. В более конкретном варианте осуществления векторы, подходящие для трансформации растений, включают векторы на основе Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, такие как описанные в EP 120516. В дополнение к трансформирующим векторам, полученным на основе Ti или Ri плазмид *Agrobacterium*, для введения генной конструкции в клетки и ткани растения могут использоваться альтернативные методы, такие как, например, помимо прочих, методика вакуумной инфльтрации.

С другой стороны, как нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, который включает (i) аминокислотную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys [SEQ ID NO: 1], в которой Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃ и Хаа₄ независимо обозначают аминокислоту, и (ii) остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в (i), которые формируют дисульфидный мостик между ними [в дальнейшем нуклеиновая кислота (a)], так и генная конструкция изобретения также могут быть включены в вектор, который включает прокариотический репликон, то есть последовательность ДНК, способную направлять автономную репликацию и поддержание внехромосомной рекомбинантной молекулы ДНК, когда она введена в прокариотическую клетку-хозяина, такую как бактерию. Указанные репликоны известны в уровне техники. Векторы, включающие прокариотический репликон, также обычно включают сайты рестрикции для вставки генной конструкции. Такие векторы известны в уровне техники и описаны, например, в патенте США 6268552.

Аналогичным образом, векторы также могут включать маркеры для проверки присутствия гетерологичной ДНК в фотосинтезирующих организмах, например клетках и/или тканях растения, или клетках водоросли, которые были трансформированы. Генетические маркеры, которые позволяют отбирать гетерологичную ДНК в указанных фотосинтезирующих организмах, например клетках растения, включают гены, которые придают устойчивость к антибиотикам, например ампициллину, тетрациклину, канамицину, гигромицину, гентамицину и т.д. Ген неомицинофосфотрансферазы обладает преимуществом возможности экспрессии как в эукариотических, так и прокариотических клетках. Маркер позволяет отбирать удовлетворительно трансформированные фотосинтезирующие организмы, например растения, выращенные в среде, содержащей

соответствующий антибиотик, поскольку они содержат подходящий ген устойчивости.

Введение указанной нуклеиновой кислоты (а), как и введение указанной генной конструкции для трансформации фотосинтезирующего организма, например клетки или ткани растения, или клетки водоросли, и получения трансгенного фотосинтезирующего организма, например трансгенного растения или трансгенной водоросли, может быть выполнено, как было указано выше, любым способом, известным в уровне техники, включая, помимо прочего, перенос ДНК, опосредованный *A. tumefaciens*, предпочтительно с использованием неонкогенного Т-ДНК вектора, электропорацию, прямой перенос ДНК, бомбардировку частицами и т.д. (для просмотра информации по указанным темам см., например, Marta Izquierdo Rojo in "Ingenieria Genetica y Transferencia Genica", 1999, Ediciones Piramide, S.A, Madrid).

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, включающей указанную нуклеиновую кислоту (а), генную конструкцию согласно изобретению или вектор, как было описано выше. Подходящие клетки-хозяева для содержания генной конструкции согласно изобретению или вектора, как было описано выше, включают, без ограничения, прокариотические клетки, дрожжи или эукариотические клетки, такие как, например, клетки насекомых. Как будет очевидно специалисту, квалифицированному в данной области, в зависимости от трансформируемой клетки-хозяина, генная конструкция изобретения или содержащий ее вектор могут содержать последовательности контроля экспрессии, которые могут быть функциональными в прокариотических клетках и организмах, например бактериях и т.д., или функциональными в эукариотических клетках и организмах, например клетках насекомых, клетках млекопитающих и т.д.

В другом аспекте изобретение относится к трансгенной клетке растения или водоросли, включающей интегрированную в ее геноме указанную нуклеиновую кислоту (а) или указанную генную конструкцию изобретения. Способы культивирования трансформированных клеток и тканей растения или водоросли и регенерации трансгенных растений или водорослей известны в уровне техники, как и условия культивирования и роста указанных растений или водорослей (см., например, Marta Izquierdo (1999), процитированную выше).

Таким образом, трансгенное растение, полученное из клетки растения, трансформированного генной конструкцией изобретения, или водоросли, трансформированной генной конструкцией изобретения, составляет дополнительный изобретательский аспект настоящего изобретения.

Применение фактора роста изобретения

Способность фактора роста изобретения увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма находит применение в различных отраслях промышленности в зависимости от фотосинтезирующего организма. Таким образом, как указано в предыдущих аспектах изобретения, фактор роста изобретения может применяться для увеличения биомассы морских водорослей или растений, которые предполагается применять в производстве энергии, при получении древесины, для питания человека или животных, или в цветоводстве как способ улучшения внешнего вида декоративных растений.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение и не должны рассматриваться как ограничивающие его возможности.

ПРИМЕР 1

Увеличение растительной биомассы в растениях моркови и табака

Материал и Методы

Каллусы моркови (*Daucus carota*) и табака (*Nicotiana tabacum*) получали от компании Carolina Biological Supply Company (Burlington, NC, USA) и поддерживали в стерильных

условиях в твердой среде для инициации роста каллуса для моркови или для табака соответственно (также предоставленной Carolina Biological). Ее определенный состав доступен в каталоге компании.

Одиночный каллус разделяли на небольшие фрагменты, полученные фрагменты
5 взвешивали в стерильных условиях и высевали на свежую среду (твердая среда для инициации роста каллуса, полученная от Carolina Biologicals), которая содержала различные концентрации синтетического человеческого пептида адреномедуллина (AM) (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA). Через 30 дней роста в темноте каллусы снова взвешивали и вычисляли скорость роста как соотношение конечного
10 веса, деленного на начальный вес.

Сухой вес каждого образца вычисляли, подвергая каллусы процессу сушки в термостате при 250°C в течение 24 часов.

Результаты

Увеличение роста каллусов в соответствии с дозозависимым ответом наблюдали и
15 в моркови, и в табаке (Фигура 1). Наиболее эффективная концентрация AM для стимуляции роста клеток составляла 10^{-10} M. Более умеренное увеличение роста происходило при более низких или более высоких концентрациях. 60%-ное увеличение биомассы по сравнению с контролем получали при оптимальной дозе AM.

Для проверки того, что такое увеличение массы не происходило вследствие
20 увеличения гидратации ткани, измеряли сухой вес ткани, и при этом обнаружили, что различия сохранялись, что указывает на то, что увеличение биомассы соответствовало чистому росту включенных тканей.

Эффект, наблюдаемый в клетках каллуса, состоящий в увеличении роста (клеточной
25 пролиферации) клеток каллуса, идеально передавался на целые растения. Иногда увеличение пролиферации клеток влияет на органолептические или физические свойства растений. Однако увеличение биомассы будет происходить в растениях так же, как это происходит в клетках каллуса.

ПРИМЕР 2

Увеличение водорослевой биомассы в водорослях рода *Chlorella*

30 **Материал и Методы**

Две идентичные культуры хлореллы приготавливали в среде Гилларда F/2 (по 250
мл каждая) в двух отдельных стеклянных колбах [Guillard, R.R.L. 1975. Culture of
phytoplankton for feeding marine invertebrates, pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H. (Eds.)
Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.; Guillard, R.R.L. and
35 Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239]. Затем 100 мкл указанной среды Гилларда F/2 добавляли в колбу и 100 мкл указанной среды Гилларда F/2, содержащей синтетический человеческий пептид-адреномедуллин (AM) (Phoenix Pharmaceuticals,
Burlingame, CA, USA) в достаточном количестве, чтобы получить конечную
40 концентрацию 10^{-8} M, в другую колбу.

Воздух, содержащий 5% CO₂, непрерывно пропускали через культуру. Колбы освещали с фотопериодом 12 часов света/12 часов темноты.

Аликвоты периодически отбирали из среды для оценки роста микроводорослей.
45 Спектральное поглощение измеряли при 680 нм с помощью спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35 UV/Visible.

Результаты

Обработанные AM микроводоросли растут быстрее и достигают стационарной фазы

скорее, чем необработанные микроводоросли.

Формула изобретения

1. Способ увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, который включает
5 культивирование указанного фотосинтезирующего организма в присутствии пептида, включающего:

(i) аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3; или

(ii) функциональный вариант пептида, определенного в (i), где указанный вариант
10 представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого обладает степенью идентичности по отношению к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 70% и сохраняет свою способность увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма, и где указанный вариант включает аминокислотную последовательность

Cys-Хаа1-Хаа2-Хаа3-Хаа4-Cys [SEQ ID NO: 1],

15 где Хаа1, Хаа2, Хаа3 и Хаа4 независимо обозначают аминокислоту, и остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, формируют дисульфидный мостик между ними.

2. Способ по п. 1, где указанный пептид является адреномедуллином, предпочтительно человеческим адреномедуллином.

3. Способ по п. 1, где указанный фотосинтезирующий организм является растением
20 или водорослью.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где указанный фотосинтезирующий организм является растением, и указанный пептид вводят в качестве добавки для дополнения питательного раствора, который подают указанному растению в гидропонной системе, или его вводят
25 к поливную воду указанного растения.

5. Способ по п. 4, где указанное растение выбрано из растения, применяемого для производства возобновляемых источников энергии; растения для питания человека или животных, породы древесины и декоративного растения.

6. Способ по любому из пп. 1-3, 5, где указанный пептид присутствует в концентрации
30 от 10^{-2} М до 10^{-16} М, предпочтительно от 10^{-6} М до 10^{-11} М, более предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-10} М.

7. Генная конструкция для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, включающая:

(a) нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, аминокислотная последовательность
35 которого показана в SEQ ID NO: 3, или его функциональный вариант, где указанный вариант представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого обладает степенью идентичности по отношению к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 70% и сохраняет свою способность увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма, и где указанный вариант
40 включает аминокислотную последовательность

Cys-Хаа1-Хаа2-Хаа3-Хаа4-Cys [SEQ ID NO: 1],

45 в которой Хаа1, Хаа2, Хаа3 и Хаа4 независимо обозначают аминокислоту, и остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, формируют дисульфидный мостик между ними, и

(b) регуляторные элементы для регуляции ее экспрессии в фотосинтезирующем организме.

8. Генная конструкция по п. 7, где указанный пептид является адреномедуллином, предпочтительно человеческим адреномедуллином.

9. Вектор для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, включающий генную конструкцию по любому из пп. 7 или 8.

10. Клетка-хозяин для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, включающая нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 3, или его функциональный вариант, где указанный вариант представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого обладает степенью идентичности по отношению к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 70% и сохраняет свою способность увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма, и где указанный вариант включает аминокислотную последовательность Cys-Хаа1-Хаа2-Хаа3-Хаа4-Cys [SEQ ID NO: 1], в которой Хаа1, Хаа2, Хаа3 и Хаа4 независимо обозначают аминокислоту, и остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, формируют дисульфидный мостик между ними, или генную конструкцию по любому из пп. 7 или 8, или вектор по п. 9.

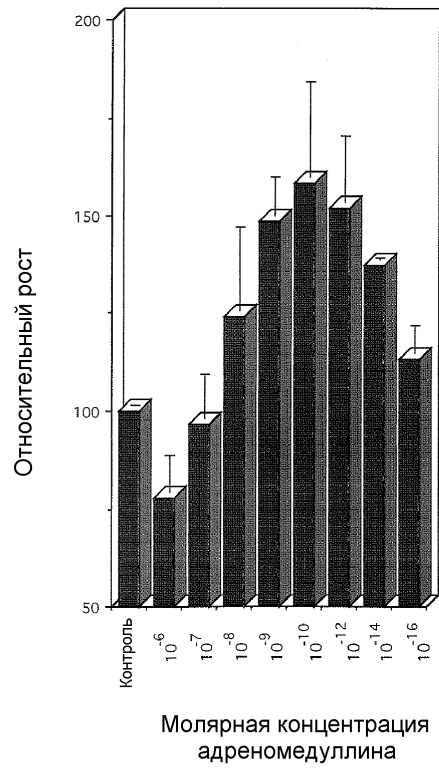
11. Клетка трансгенного фотосинтезирующего организма для увеличения биомассы фотосинтезирующего организма, включающая интегрированную в ее геноме нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 3, или его функциональный вариант, где указанный вариант представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого обладает степенью идентичности по отношению к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 70% и сохраняет свою способность увеличивать биомассу фотосинтезирующего организма, и где указанный вариант включает аминокислотную последовательность Cys-Хаа1-Хаа2-Хаа3-Хаа4-Cys [SEQ ID NO: 1], в которой Хаа1, Хаа2, Хаа3 и Хаа4 независимо обозначают аминокислоту, и остатки цистеина аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, формируют дисульфидный мостик между ними, или генную конструкцию по любому из пп. 7 или 8.

12. Трансгенный фотосинтезирующий организм, включающий по меньшей мере одну клетку трансгенного фотосинтезирующего организма по п. 11, где трансгенный фотосинтезирующий организм обладает увеличенной биомассой по сравнению с нетрансгенным организмом.

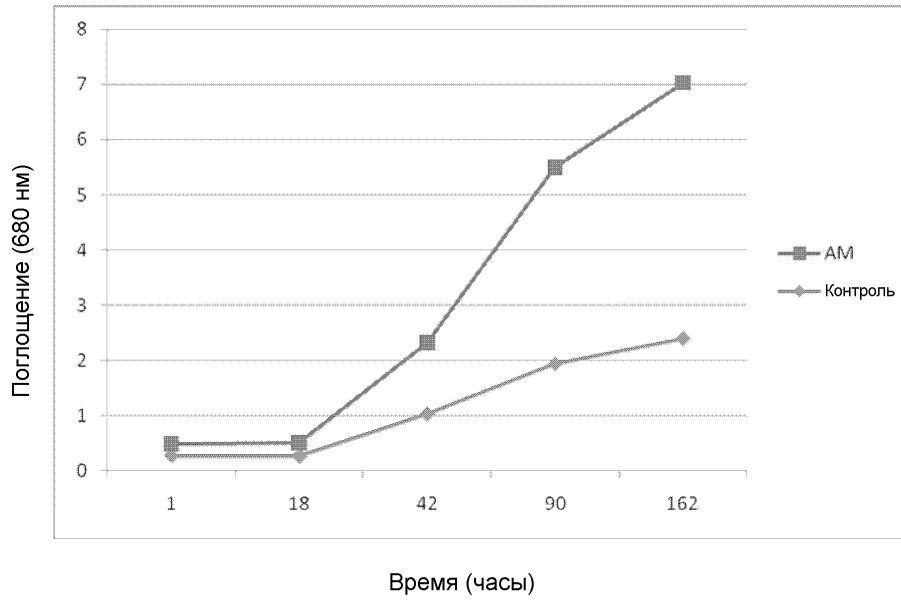
35

40

45



ФИГ. 1



ФИГ. 2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BioMass Booster, S.L.
 <120> СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОМАССЫ РАСТЕНИЯ
 <130> P5680PC00
 <150> EP 10382143.5
 <151> 2010-05-25
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мотив, содержащийся в факторе роста изобретения
 <220>
 <221> другие особенности
 <222> (2)..(5)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой
 <400> 1
 Cys Хаа Хаа Хаа Хаа Cys
 1 5
 <210> 2
 <211> 185
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
 20 25 30
 Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
 35 40 45
 Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
 50 55 60
 Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
 85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
 100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
 115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
 130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
 145 150 155 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
 165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
 180 185

<210> 3
 <211> 52
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (16)..(21)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (52)..(52)
 <223> АМИДИРОВАНИЕ

<400> 3

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
 20 25 30

Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
 35 40 45

Pro Gln Gly Tyr
 50

<210> 4
 <211> 78
 <212> БЕЛОК
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (38)..(43)

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (69)..(73)
 <223> МОТИВ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (78)..(78)
 <223> АМИДИРОВАНИЕ

<400> 4

Met Leu Asp Thr Leu Ile Gly Gly Ile Val Gly Gly Ile Ala Gly Ala
 1 5 10 15

Ile Ile Gly Thr Val Asp Gly Phe Ala Arg Gly Ile Gly Ile Cys Pro
 20 25 30

Asp Ser Tyr Gln Ser Cys Thr Arg Thr Asp Cys Glu Glu His Lys Lys
 35 40 45

Lys Leu Pro Thr Asn Leu Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ala Ala Val Lys
 50 55 60

Ala Lys Glu Asn Gly Arg Arg Arg Arg Gln Lys Asp Arg Glu
 65 70 75

<210> 5
 <211> 222
 <212> БЕЛОК
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (157)..(162)

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (185)..(189)
 <223> МОТИВ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (222)..(222)
 <223> АМИДИРОВАНИЕ

<400> 5

Met Asp Pro Lys Ser Cys Glu Asn Ser Ser Asp Val Lys Gly Gln Thr
 1 5 10 15

4

Ser Asp Ser Val Ser Lys Lys Val Leu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Val
 20 25 30

Lys Lys Pro Gln Gln Gly Lys Glu Asn Asp Ser Arg Met Ala Lys Asp
 35 40 45

Val Val Ser Cys Ser Ser Asn Ile Ser Ala His Val Val His Glu Glu
 50 55 60

Val Ala Asp Asn Val Thr Ala Val Ser Cys Asn Glu Ala Glu Ser Asp
 65 70 75 80

Ile Ser Lys Ala Lys Ala Lys Glu Phe His Thr Ile Asp Leu Ser Gly
 85 90 95

Val Gly Glu Arg Ile Cys Arg Ile Cys His Phe Gly Ser Asp Gln Ser
 100 105 110

Pro Glu Ala Ser Gly Asp Asp Lys Ser Val Ser Pro Glu Leu Ile Glu
 115 120 125

Ile Gly Cys Lys Cys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ala His Phe His Cys
 130 135 140

Ala Glu Ala Trp Phe Lys Leu Arg Gly Asn Ser Val Cys Glu Ile Cys
 145 150 155 160

Gly Cys Thr Ala Lys Asn Val Thr Val Arg Leu Met Glu Asp Trp Ser
 165 170 175

Gly Glu Arg Asp Asn Thr Leu Asp Gly Arg Arg Arg Arg Gly Arg Gly
 180 185 190

Gln Ser Cys Cys Ile Phe Met Val Phe Leu Leu Thr Ile Leu Leu Leu
 195 200 205

His Trp Phe Phe Lys Lys Ile Ser Gly Tyr Tyr Gln Asn Thr
 210 215 220

<210> 6
 <211> 218
 <212> БЕЛОК
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (49)..(54)

<220>
 <221> САЙТ

5

<222> (93)..(97)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (218)..(218)

<223> АМИДИРОВАНИЕ

<400> 6

Met Gly Asp Val Ile Leu Phe Ile Asp Asp Thr Lys Ser Lys Val Arg
 1 5 10 15

Ile Thr Arg Cys Arg Ile Cys His Glu Glu Glu Glu Glu Ser Phe Phe
 20 25 30

Glu Val Pro Cys Ala Cys Ser Gly Thr Val Lys Phe Ala His Arg Asn
 35 40 45

Cys Ile Gln Arg Trp Cys Asn Glu Lys Gly Asn Thr Thr Cys Glu Ile
 50 55 60

Cys Leu Gln Val Tyr Lys Asp Gly Tyr Thr Ala Val Leu Lys Gln Ser
 65 70 75 80

Lys Leu Ile Glu Gln Glu Val Thr Ile Arg Val Asn Gly Arg Arg Arg
 85 90 95

Arg Arg Ser Arg Arg Leu Val Ser Ile Ala Glu Ser Asp Ile Ser Gln
 100 105 110

Cys Asn Ser Val Ala Asp Arg Gly Ala Ser Phe Cys Arg Ser Leu Thr
 115 120 125

Phe Thr Leu Ser Val Phe Leu Leu Met Lys His Thr Phe Asp Val Ile
 130 135 140

Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Pro Phe Ser Val Phe Thr Val Leu Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Ala Ile Gly Ile Leu Leu Pro Met Phe Ile Ile Ile Arg Thr Ile
 165 170 175

Ser Thr Ile Gln Lys Thr Leu Arg Arg Arg His Gln Tyr Pro Glu Ser
 180 185 190

Glu Glu Glu Asp Arg Leu Ser Ser Asp Asp Asp Asp Asp Leu Glu Glu
 195 200 205

Glu Asp Glu Glu Gln Gln Gln His Leu Ala
 210 215

<210> 7
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный

<220>
 <223> Мотив

<400> 7

Gly Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 8
 <211> 198
 <212> БЕЛОК
 <213> *Oryza sativa*

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (124)..(129)

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (171)..(175)
 <223> МОТИВ ,

<400> 8

Met Glu Ala Ala Pro Arg Asp Asp Lys Pro Ala Arg Met Asn Ser Glu
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Gly His Arg Arg Trp Gly Ser Asp Gly Gly Glu Ala Met
 20 25 30

Pro Arg Thr Thr Ser Pro Val Arg Arg Cys Asp Ala Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Val Ala Asp Ser Ala Trp Glu Glu Glu Gly Pro Thr Gly Glu Ile
 50 55 60

Pro Ala Arg Arg Met Glu Arg Pro Ala Arg His Gly Gly Val Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Tyr Gly Arg Arg Leu Asp Gly Glu Asp Asp Gly Val Leu Val Pro
 85 90 95

Gly Glu Val Val Ala Thr Ser Ala Ser Ala Gln Glu Thr Arg Gln Arg
 100 105 110

Arg Pro Glu Ala Glu Gln Trp Arg Gln Arg His Cys Cys Arg Arg Gly
 115 120 125

7

Cys Thr Ser Gly Gly Val Arg Gly Lys Arg Arg Ala Gly Arg Gly Arg
 130 135 140

Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Gly Gly Gly Asp Gly Thr Ala Gly Arg Arg
 145 150 155 160

Ala Asp Ala Ala Ala Gly Val Ala Gly Phe Gly Arg Arg Arg Arg Arg
 165 170 175

Glu Arg Arg Ser Ala Thr Val Trp Leu Gly Arg Ser Gly Arg Gly Lys
 180 185 190

Thr Glu Gly Glu Val Asp
 195

<210> 9
 <211> 1090
 <212> БЕЛОК
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (5)..(10)

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (51)..(55)

<400> 9

Met His Ala Ala Cys Leu Cys Ser Thr Cys Cys Ser Cys Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Cys Ala Ala Arg Arg Pro Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Cys Ser Arg
 20 25 30

Gly Arg Thr Pro Cys Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Pro Ala Ser Ser
 35 40 45

Gly Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Ser Arg Thr Arg Thr Pro Arg
 50 55 60

Arg Gly Ala Arg Gly Ala Ala Trp Arg Arg Arg Val Gly Arg Arg Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Arg Arg Gly Gly Ala Gly Val Ala Gly Thr Leu Asp Ala Leu
 85 90 95

Asp Leu Ser Ser Leu Pro Gly Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Leu Asn
 100 105 110

Ser Leu Thr Gly Ser Phe Pro Ser Asn Val Ser Ser Pro Leu Leu Ser
 115 120 125

Leu Arg Ser Ile Asp Leu Ser Ser Asn Asn Leu Ser Gly Pro Ile Pro
 130 135 140

Ala Ala Leu Pro Ala Leu Met Pro Asn Leu Glu His Leu Asn Leu Ser
 145 150 155 160

Ser Asn Gln Phe Ser Gly Glu Ile Pro Ala Ser Leu Ala Lys Leu Thr
 165 170 175

Lys Leu Gln Ser Val Val Leu Gly Ser Asn Leu Leu His Gly Gly Val
 180 185 190

Pro Pro Val Ile Gly Asn Ile Ser Gly Leu Arg Thr Leu Glu Leu Ser
 195 200 205

Gly Asn Pro Leu Gly Gly Ala Ile Pro Thr Thr Leu Gly Lys Leu Arg
 210 215 220

Ser Leu Glu His Ile Asn Val Ser Leu Ala Gly Leu Glu Ser Thr Ile
 225 230 235 240

Pro Asp Glu Leu Ser Leu Cys Ala Asn Leu Thr Val Ile Gly Leu Ala
 245 250 255

Gly Asn Lys Leu Thr Gly Lys Leu Pro Val Ala Leu Ala Arg Leu Thr
 260 265 270

Arg Val Arg Glu Phe Asn Val Ser Lys Asn Met Leu Ser Gly Glu Val
 275 280 285

Leu Pro Asp Tyr Phe Thr Ala Trp Thr Asn Leu Glu Val Phe Gln Ala
 290 295 300

Asp Gly Asn Arg Phe Thr Gly Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr Met Ala
 305 310 315 320

Ser Arg Leu Glu Phe Leu Ser Leu Ala Thr Asn Asn Leu Ser Gly Ala
 325 330 335

Ile Pro Pro Val Ile Gly Thr Leu Ala Asn Leu Lys Leu Leu Asp Leu
 340 345 350

Ala Glu Asn Lys Leu Ala Gly Ala Ile Pro Arg Thr Ile Gly Asn Leu
 355 360 365

Thr Ser Leu Glu Thr Leu Arg Leu Tyr Thr Asn Lys Leu Thr Gly Arg
 370 375 380
 Leu Pro Asp Glu Leu Gly Asp Met Ala Ala Leu Gln Arg Leu Ser Val
 385 390 400
 Ser Ser Asn Met Leu Glu Gly Glu Leu Pro Ala Gly Leu Ala Arg Leu
 405 410 415
 Pro Arg Leu Val Gly Leu Val Ala Phe Asp Asn Leu Leu Ser Gly Ala
 420 425 430
 Ile Pro Pro Glu Phe Gly Arg Asn Gly Gln Leu Ser Ile Val Ser Met
 435 440 445
 Ala Asn Asn Arg Phe Ser Gly Glu Leu Pro Arg Gly Val Cys Ala Ser
 450 455 460
 Ala Pro Arg Leu Arg Trp Leu Gly Leu Asp Asp Asn Gln Phe Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Val Pro Ala Cys Tyr Arg Asn Leu Thr Asn Leu Val Arg Leu Arg
 485 490 495
 Met Ala Arg Asn Lys Leu Ala Gly Asp Val Ser Glu Ile Leu Ala Ser
 500 505 510
 His Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Phe Asp Gly
 515 520 525
 Glu Leu Pro Glu His Trp Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Phe Leu His
 530 535 540
 Leu Ser Gly Asn Lys Ile Ala Gly Ala Ile Pro Ala Ser Tyr Gly Ala
 545 550 555 560
 Met Ser Leu Gln Asp Leu Asp Leu Ser Ser Asn Arg Leu Ala Gly Glu
 565 570 575
 Ile Pro Pro Glu Leu Gly Ser Leu Pro Leu Thr Lys Leu Asn Leu Arg
 580 585 590
 Arg Asn Ala Leu Ser Gly Arg Val Pro Ala Thr Leu Gly Asn Ala Ala
 595 600 605
 Arg Met Glu Met Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ala Leu Asp Gly Gly Val
 610 615 620

Pro Val Glu Leu Thr Lys Leu Ala Glu Met Trp Tyr Leu Asn Leu Ser
625 630 635 640

Ser Asn Asn Leu Ser Gly Glu Val Pro Pro Leu Leu Gly Lys Met Arg
645 650 655

Ser Leu Thr Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Pro Gly Leu Cys Gly His
660 665 670

Asp Ile Ala Gly Leu Asn Ser Cys Ser Ser Asn Thr Thr Thr Gly Asp
675 680 685

Gly His Ser Gly Lys Thr Arg Leu Val Leu Ala Val Thr Leu Ser Val
690 695 700

Ala Ala Ala Leu Leu Val Ser Met Val Ala Val Val Cys Ala Val Ser
705 710 715 720

Arg Lys Ala Arg Arg Ala Ala Val Val Val Glu Lys Ala Glu Thr Ser
725 730 735

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Thr Ala Ala Ala Val Gln Ala Ser
740 745 750

Ile Trp Ser Lys Asp Thr Thr Phe Ser Phe Gly Asp Ile Leu Ala Ala
755 760 765

Thr Glu His Phe Asn Asp Ala Tyr Cys Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly
770 775 780

Thr Val Tyr Arg Ala Asp Leu Gly Gly Gly Arg Ala Val Ala Val Lys
785 790 795 800

Arg Leu Asp Ala Ser Glu Thr Gly Asp Ala Cys Trp Gly Val Ser Glu
805 810 815

Arg Ser Phe Glu Asn Glu Val Arg Ala Leu Thr Arg Val Arg His Arg
820 825 830

Asn Ile Val Lys Leu His Gly Phe Cys Ala Met Gly Gly Tyr Met Tyr
835 840 845

Leu Val Tyr Glu Leu Ala Glu Arg Gly Ser Leu Gly Ala Val Leu Tyr
850 855 860

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Arg Phe Asp Trp Pro Ala Arg Met
865 870 875 880

11

Arg Ala Ile Arg Gly Val Ala His Ala Leu Ala Tyr Leu His His Asp
 885 890 895

Cys Ser Pro Pro Met Ile His Arg Asp Val Ser Val Asn Asn Val Leu
 900 905 910

Leu Asp Pro Asp Tyr Glu Pro Arg Val Ser Asp Phe Gly Thr Ala Arg
 915 920 925

Phe Leu Val Pro Gly Arg Ser Thr Cys Asp Ser Ile Ala Gly Ser Tyr
 930 935 940

Gly Tyr Met Ala Pro Glu Leu Ala Tyr Met Arg Val Thr Thr Lys Cys
 945 950 955 960

Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Ala Met Glu Met Leu Met Gly Lys
 965 970 975

Tyr Pro Gly Gly Leu Ile Ser Ser Leu Gln His Ser Pro Gln Ser Leu
 980 985 990

Ser Ala Glu Gly His Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Ala
 995 1000 1005

Ser Ala Ser Ala Ser Arg Arg Leu Leu Leu Lys Asp Val Val Asp
 1010 1015 1020

Gln Arg Leu Asp Ala Pro Ala Gly Lys Leu Ala Gly Gln Val Val
 1025 1030 1035

Phe Ala Phe Val Val Ala Leu Ser Cys Val Arg Thr Ser Pro Asp
 1040 1045 1050

Ala Arg Pro Thr Met Arg Ala Val Ala Gln Glu Leu Ala Ala Arg
 1055 1060 1065

Arg Arg Pro Ile Leu Asp Arg Pro Phe Glu Met Ile Lys Ile Gly
 1070 1075 1080

Asp Leu Thr Asn Ser His Arg
 1085 1090

<210> 10
 <211> 100
 <212> БЕЛОК
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД

12

<222> (42)..(47)

<220>

<221> САЙТ

<222> (66)..(70)

<223> МОТИВ

<400> 10

Met Ser Arg Arg Gly Thr Arg Arg Gln Arg Asp Gly Asn Gly Asp Arg
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ser Thr Ser Pro Ser His Gly Pro
20 25 30

Ala Gly Gly Trp Ala Ser Gln Ile Arg Cys Cys Gly Ala Trp Cys Gly
35 40 45

Gly Arg Thr Ser Val Ala Val Met Leu Gly Asp Gly Ala Pro Val Leu
50 55 60

Leu Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Ser Ser Leu Leu Leu Met
65 70 75 80

Leu Phe Phe Phe Phe Phe Phe His Val Gln Asn Ala Cys Met Pro Cys
85 90 95

Ser Leu Ala Cys
100

<210> 11

<211> 357

<212> БЕЛОК

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> ДИСУЛЬФИД

<222> (256)..(261)

<220>

<221> САЙТ

<222> (307)..(311)

<400> 11

Met Ala Pro Ala Leu Cys Gly Asp Leu Ile Ser Thr Arg Arg Ser Phe
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ala Trp Thr Leu Thr Thr Leu Leu Ser Phe Phe Ser Phe
20 25 30

Val Val Ala Val Phe Leu Ala Gly Arg Ile Asn Gln Gln Tyr Ile Ser
35 40 45

Met Thr Ser Gly Asp Tyr Ala Glu Trp Tyr Thr His Glu Tyr Gly Asn
 50 55 60

Asp Phe Tyr Asp Arg Leu Leu Glu Glu Gly Ser Gly Glu Cys Cys Arg
 65 70 75 80

Tyr Leu Glu Gly Gly Glu Glu Gly Gly Gly Gly Glu Gln Gln Arg Glu
 85 90 95

Gly Glu Asp His Asp Arg Gln Glu Gly Gly Ser Asn Asp Arg Asn Gln
 100 105 110

Leu Asp Ala Glu Phe Phe Gln Ser Leu Ala Asn Ala Asn Ser Arg Ser
 115 120 125

Leu Glu Phe Ala Gly Val Tyr Thr Thr Val Leu Gly Ile Ala Leu Ser
 130 135 140

Leu Tyr Gly Ser Thr Val Val Val Gly Phe Met Ser Leu Lys Gly Glu
 145 150 155 160

Tyr Ile Pro Pro Cys Phe Ser Phe Arg Ser Met Ser Met Ile Glu Glu
 165 170 175

Glu Gly Glu Val Gly Val Glu Asp Ala Asp Thr Gly Pro Arg Asn Leu
 180 185 190

Trp Gly Glu Lys Ile His Arg Gly Val Phe Leu Gly Cys Leu Val Ile
 195 200 205

Phe Ala Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala Val Ile Phe Gly Glu Leu Glu
 210 215 220

Val His Asp Asn Tyr Asn Asn Tyr Asp Gln Gln Asn Asn Asp Asn Ile
 225 230 235 240

Phe Ser Tyr Arg Ile Glu Lys Ile Ser Ser Val Phe Ala Ile Thr Cys
 245 250 255

Ile Val Leu Ala Cys Val Tyr Val Leu Phe Ala Val Ile Tyr Leu Ser
 260 265 270

Cys Gly Gly Met Leu Asp Asp Asp Asn Asp Thr Val Gln His Asn Thr
 275 280 285

Gly Asn Trp Met Asp His Ser His Ser Gln Phe Glu Leu Ser Pro Arg
 290 295 300

Gly Asn Gly Arg Arg Arg Arg Arg Gly Arg Arg Asp Met Pro Asp Lys
305 310 315 320

Ala Glu Pro Leu Val Ser Ala Val Gly Gly Gly Ile Thr Glu Ile Gly
325 330 335

Cys Ala Thr Arg Ser Asp Glu Arg Ala Tyr Val Leu Asp Glu Gly Cys
340 345 350

Ile Asp Glu Thr Thr
355