



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121663** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01H 5/00
C12N 15/32 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 04657	WO 2011/041256 A2, 07.04.2011
(22) Дата подання заявки:	15.10.2015	WO 2014/055881 A1, 10.04.2014
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.07.2020	EP 0358557 A2, 14.03.1990
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/064,994, 62/065,017	Wagner Lucena et al, "Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of Bacillus thuringiensis Cry Toxins", Toxins, 13.08.2014, vol. 6, no. 8, P. 2393 - 2423
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16.10.2014, 17.10.2014	Saraswathy Nachimuthu et al, "Protein engineering of delta-endotoxins of Bacillus thuringiensis", EJB Electronic Journal of Biotechnology, Conicyt, Santiago, CL, 15.08.2004, vol. 7, no. 2, P. 178 - 188
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US	Pardo-Lopez L et al, "Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from Bacillus thuringiensis", Peptides, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 30, no. 3, 19.08.2008, P. 589 - 595
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.07.2017, Бюл.№ 14	Kim Y S et al, "Mutagenesis of Bacillus thuringiensis cry1Ac gene and its insecticidal activity against Plutella xylostella and Ostrinia furnacalis", Biological Control, San Diego, CA, US, vol. 47, no. 2, 29.07.2008, P. 222 - 227
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.07.2020, Бюл.№ 13	Yu Ren et al, "Effect of Cry1Ca7 protein modified by site-directed mutagenesis on inhibiting Spodoptera exigua Hubner", Acta Microbiologica Sinica - Weishengwu Xuebao, 04.06.2008, vol. 48, no. 6, P. 733 - 738
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2015/055779, 15.10.2015	H Höfte et al, "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of new Lepidoptera-specific crystal protein gene from Bacillus thuringiensis", Nucleic Acids Research, GB, 25.09.1990, vol. 18, no. 18, P. 5545 - 5545
(72) Винахідник(и): Баум Джеймс А. (US), Черуті Томас (US), Фласінські Станіслав (US), Фу Сяожань (US), Хау Ерлін Р. (US), Сальвадор Сара Ен (US)		Hofte H et al, "Insecticidal Crystal Proteins of Bacillus Thuringiensis", Microbiological Reviews, American Society for Microbiology, Washington, DC, US, 01.06.1989, vol. 53, P. 242 - 255
(73) Власник(и): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖІ ЛЛС, 800 N. Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, Missouri 63167, United States of America (US)		Crickmore N et al, "Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins", Microbiology and Molecular Biology Reviews, American Society for Microbiology, US, 01.09.1998, vol. 62, no. 3, P. 807 - 813
(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367		F. Rajamohan et al, "Protein engineering of Bacillus thuringiensis -endotoxin: Mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae", Proceedings of the National Academy of Sciences, US, 10.12.1996, vol. 93, no. 25, P. 14338 - 14343
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2005/155103 A1, 14.07.2005		

UA 121663 C2

(54) СКОНСТРУЙОВАНИЙ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК, ЯКИЙ МАЄ АКТИВНІСТЬ ПРОТИ ЛУСКОКРИЛИХ

(57) Реферат:

Винахід стосується сконструйованого інсектицидного білка, який має інгібіторну активність відносно видів комах ряду Lepidoptera. Винахід також стосується полінуклеотиду, який кодує сконструйований інсектицидний білок, клітини-хазяїна, яка містить полінуклеотид, композиції, яка має інгібуючу активність відносно комах, насіння, трансгенної клітини рослини, товарного продукту, рекомбінантної полінуклеотидної молекули, молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, способу боротьби з лускокрилим шкідником та способу отримання насіння.

ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕННІ ЗАЯВКИ

[0001] Ця заявка заявляє пріоритет за попередніми заявками США 62/064994, поданої 16 жовтня 2014 року і 62/065017, поданої 17 жовтня 2014 р., які включені в повному обсязі в цей документ шляхом посилань.

5 ВКЛЮЧЕННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0002] Форма переліку послідовностей для машинного зчитування подана в електронному вигляді. Перелік послідовностей, включений шляхом посилання в повному обсязі, міститься у файлі, створеному 13 жовтня 2015 року, з ім'ям файлу P34223WO00_SEQ_PCT.txt і розміром 327235 байт (виміряно в операційній системі MS-Windows®).

10 ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

[0003] Винахід в цілому відноситься до області білків, які здійснюють інгібуючу дію на комах. Розкривається новий клас сконструйованих білків, які проявляють інсектицидну інгібуючу активність проти сільськогосподарських шкідників сільськогосподарських культур і насіння. Зокрема, розкритий клас сконструйованих інгібуючих білків, які мають інсектицидну активність по відношенню до лускокрилих комах-шкідників. Передбачені рослини, частини рослин і насіння, що містять поліплектоидний конструкт, який кодує один або більше розкритих сконструйованих інгібуючих білків.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0004] *Helicoverpa zea* є характерним лускокрилим шкідником основних сільськогосподарських культур, включаючи кукурудзу, бавовник і сою. Відомий як кукурудзяна совка (CEW), бавовняна совка (CBW) і коробковий черв'як (SPW), цей вид багатоядних комах особливо важко контролювати за допомогою інсектицидних білків *Bacillus thuringiensis* (B) або інших видів бактерій. *H. zea* вважається схильним до ризику розвитку резистентності до сучасних способів контролю комах, з огляду на його здатність харчуватися безліччю різних культур і відсутність в 25 цей час стратегії контролю високих доз. Відповідно, необхідні нові способи впливу (CB) для забезпечення довговічності трансгенних рослин, захищених від пошкодження в результаті харчування *H. zea*.

[0005] Білок Cry1Da1 є лускокрило-активним білком, який був вперше описаний Hofte, et al. "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new Lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*." *Nucleic Acids Res.* 18(18) (1990): 5545. Цей білок проявляє відмінну інсектицидну активність по відношенню до видів роду *Spodoptera*, включаючи *Spodoptera frugiperda* (кукурудзяну листову совку, FAW), шкідника деяких просапних культур, включаючи кукурудзу, бавовник і сою. Однак Cry1Da1 проявляє низьку або помірну активність по відношенню до цілого ряду інших основних комах-шкідників, включаючи бавовняну сойку (наприклад, *Helicoverpa armigera* і *H. zea*), вогнівок (наприклад, *Ostrinia nubilalis* і *Diatraea grandiosella*) і соєву совку (*Pseudoplusia includens*). Через його вузький інсектицидний спектр та його нездатності забезпечити комерційний захист від ряду важливих лускокрилих сільськогосподарських шкідників, таких як CEW, інсектицидний білок Cry1Da1 має обмежене значення як ознака боротьби з комахами в трансгенних рослинах. В результаті ніякі сучасні 40 комерційні сорти культур, захищені від комах, не використовують Cry1Da1 як включений в рослину засіб захисту.

[0006] Незважаючи на свій вузький інсектицидний спектр, Cry1Da1 є цікавим інсектицидним білком, тому що здається, що білок Cry1Da1 використовує альтернативні СВ для боротьби з деякими комахами-шкідниками. Доказом цього служать дослідження колоній комах з 45 множинною стійкістю. Наприклад, отримані з поля колонії *Plutella xylostella* (капустяної молі) та *Pectinophora gossypiella* (бавовняної молі), які стійкі до інтоксикації Cry1Ac, зберігають повну чутливість до білка Cry1Da1 (Tabashnik et al. "Cross-Resistance of Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins." *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000). 4582-4584; Tabashnik, et al. "Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ja in a Strain of Diamondback Moth Adapted to Artificial Diet." *J. Invert. Pathol.* 76: 2000: 81-83. Ці дані свідчать про те, що Cry1Da1 розпізнає рецептори середньої кишки лускокрилих, відмінні від тих, які розпізнаються лускокрило-активними білками, які в цей час впроваджені в трансгенні сільськогосподарські культури, включаючи Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1Fa, Cry2Ae і Cry2Ab2. У світлі цього очевидного нового СВ оптимізація Cry1Da1-подібних білків для поліпшення активності проти 55 більш широкого спектра видів роду *Helicoverpa* при збереженні або збільшенні їх інсектицидної активності по відношенню до видів роду *Spodoptera* могла б створити включений в рослини, високоякісний захист для боротьби з резистентністю комах.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0007] У цьому винаході ідентифіковані декілька варіантів амінокислотних послідовностей 60 каркасних білків TIC844 і Cry1Da, які проявляють помітно поліпшену активність (у порівнянні з

нативним токсином Cry1Da1) по відношенню до *H. zea*, зберігаючи при цьому відмінну активність по відношенню до *S. frugiperda*. Покращені варіанти TIC844 і Cry1Da були розроблені, для експресії в сільськогосподарських рослинах (наприклад, кукурудзі, сої, бавовнику, цукрової тростині), і надають нові варіанти для управління стійкістю *in planta* (в рослині) і боротьби з комахами-шкідниками в силу очевидного унікального способу впливу Cry1Da в поєднанні з поліпшеною активністю проти *H. zea*.

[0008] Розкриті в цьому документі сконструйовані токсичні білки лускокрилих (звані в цьому документі «сконструйовані білкові токсини», «сконструйовані токсичні білки» або «сконструйовані інсектицидні білки») є похідними природного інсектицидного токсину *Bacillus thuringiensis* Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) або химерного гомолога Cry1Da1, TIC844 (SEQ ID NO: 14), які містять основний токсин Cry1Da1, але мають замінений протоксин Cry1Ab3 на нативний Cry1Da1-протоксिनний домен. Сконструйовані інсектицидні білки за цим винаходом кожен містить щонайменше одну амінокислотну заміну, одне амінокислотне приєднання або одну амінокислотну делецію в порівнянні з каркасними білками, представленими в будь-якій з SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14. Сконструйовані інсектицидні білки за цим винаходом є особливо токсичними для комах видів *Helicoverpa zea* (кукурудзяна совка, бавовняна совка, коробковий черв'як) і *Spodoptera frugiperda* (кукурудзяна листовая совка). Хоча каркасні білки TIC844 (SEQ ID NO: 14) і Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) проявляють низьку токсичність по відношенню до *H. zea*, інсектицидні білки, запропоновані в цьому винаході, мають дивовижну і несподівано поліпшену інсектицидну активність і поліпшений інсектицидний спектр проти лускокрилих комах-шкідників, включаючи *H. zea*.

[0009] У деяких варіантах реалізації винаходу запропонований інсектицидний білок, що містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 42, або її фрагмент, що має інгібуючу активність по відношенню до комах. У деяких варіантах реалізації винаходу інсектицидний білок проявляє інгібуючу активність по відношенню до видів комах ряду *Lepidoptera* (Лускокрилі). Види лускокрилих шкідників, які мають негативний вплив на сільське господарство, включають, без обмеження, кукурудзяну листову совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малу (*Spodoptera exigua*), совку латукову (*Mamestra configurata*), совку-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустяну (*Trichoplusia ni*), соєву совку (*Chrysodeixis includens*), совку оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatalis*), совку конюшинову (*Hypena scabra*), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), совку бавовняну (*Agrotis subterranea*), совку лугову (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямокутну (*Agrotis orthogonia*), метелика стеблогового кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), метелика-вогнівку (*Amyeloides transitella*), кукурудзяну вогнівку (*Crambus caliginosellus*), лугового метелика (*Herpetogramma licarsialis*), вогнівку соняшникову (*Homoeosoma electellum*), точильника зернового кукурудзяного (*Elasmopalpus lignosellus*), плоджерку яблуневу (*Cydia pomonella*), листовійку винограду (*Endopiza viteana*), листовійку східну персикову (*Grapholita molesta*), листовійку брунькову соняшнику (*Suleima helianthana*), капустяну моль (*Plutella xylostella*), рожевого коробкового хробака (*Pectinophora gossypiella*), рожеву стеблову совку (*Sesamia inferens*), шовкопряда непарного (*Lymantria dispar*), совку бавовняну американську (*Alabama argillacea*), листовійку плодівих дерев (*Archips argyrospila*), листовійку різану золотисту (*Archips rosana*), вогнівку азіатську стеблову або вогнівку жовту рисову (*Chilo suppressalis*), листовійку рисову (*Sparganothis medinalis*), кукурудзяну вогнівку (*Crambus caliginosellus*), метелика трав'яного (*Crambus teterrellus*), вогнівку кукурудзяну південно-західну (*Diatraea grandiosella*), вогнівку цукрової тростини (*Diatraea saccharalis*), совку бавовняну єгипетську (*Earias insulana*), совку плямисту (*Earias vittella*), совку американську (*Helicoverpa armigera*), совку бавовняну або американську кукурудзяну совку (*Helicoverpa zea*), лугового метелика (*Herpetogramma licarsialis*), грону листувійку (*Lobesia botrana*), цитрусового мінуючого метелика (*Phyllocnistis citrella*), білявку капустяну (*Pieris brassicae*), репніцу або білявку ріпняну (*Pieris rapae*), азіатську бавовникову совку або азіатську бавовняну совку (*Spodoptera litura*) і пасльонового мінера (*Tuta absoluta*).

[0010] Також в цьому документі розкритий полінуклеотид, що кодує сконструйований інсектицидний білок або його фрагмент, що має пестицидну активність, причому полінуклеотид функціонально зв'язаний з гетерологічним промотором, а сконструйований інсектицидний білок містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 42.

[0011] В іншому варіанті реалізації винаходу, в цьому документі розкритий полінуклеотид, який кодує сконструйований інсектицидний білок, причому полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка необов'язково гібридується в жорстких умовах із зворотним комплементом полінуклеотидної послідовності, зазначеної в будь-якій з SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 або SEQ ID NO: 41; або кодує сконструйований інсектицидний білок, що містить амінокислотну послідовність, зазначену в будь-якій з SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 42.

[0012] Також в цьому документі запропонована клітина-хазяїн, що містить полінуклеотид, представлений в будь-якій з SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 або SEQ ID NO: 41, причому клітина-хазяїн вибрана з групи, що складається з бактеріальної клітини-хазяїна або рослинної клітини-хазяїна. Розглянуті бактеріальні клітини-хазяї включають бактеріальні клітини-хазяї, вибрані з групи, що складається з *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, і *Erwinia*, причому вид роду *Bacillus* являє собою *Bacillus cereus* або *Bacillus thuringiensis*, зазначений *Brevibacillus* являє собою *Brevibacillus laterosperous*, а зазначена *Escherichia* являє собою *Escherichia coli*. Крім того, передбачувані рослинні клітини-хазяї включають однодольні або дводольні рослини.

[0013] У ще одному варіанті реалізації винаходу запропонована композиція, яка має інгібуючу активність по відношенню до комах, що містить сконструйований інсектицидний білок, який містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 42, або її фрагмент, що має інгібуючу активність по відношенню до комах. Передбачається, що ця композиція, яка має інгібуючу активність по відношенню до комах може додатково містити щонайменше один агент, який має інгібуючу активність по відношенню до комах, відмінний від сконструйованого інсектицидного білка. Розглянуті агенти, які мають інгібуючу активність по відношенню до комах, включають білок, що має інгібуючу активність по відношенню до комах, молекулу дцРНК, що має інгібуючу активність по відношенню до комах і хімічний склад, що має інгібуючу активність по відношенню до комах. Передбачається, що, щонайменше, один інший пестицидний агент може проявляти активність у відношенні одного або декількох видів шкідників рядів *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Homoptera* або *Thysanoptera*.

[0014] Також розкрита в цьому документі насінина, яка містить інгібуюче ефективну по відношенню до комах кількість сконструйованого інсектицидного білка, що містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 42; або полінуклеотид, зазначений в будь-якій з SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 або SEQ ID NO: 41.

[0015] Спосіб боротьби з лускокрилими комахами-шкідниками, що включає приведення в контакт лускокрилої комахи-шкідника з інгібуючою кількістю сконструйованого інсектицидного білка, також розкрито в цьому документі в іншому варіанті реалізації винаходу.

[0016] У ще одному варіанті реалізації винаходу, в цьому документі розкрита трансгенна клітина рослини, рослина або частина рослини, що містять сконструйований інсектицидний білок. Запропоновано способи боротьби з лускокрилою комахою-шкідником, які включають надання шкіднику трансгенної клітини рослини, рослини або частини рослини, що містять сконструйований інсектицидний білок. Розглядаються також матеріали, отримані з клітини рослини, рослини або частини рослини, що містять сконструйований інсектицидний білок, причому продукт містить кількість сконструйованого інсектицидного білка, яку можливо визначити. Розглянуті матеріали включають біомасу рослин, масло, борошно грубого помелу, корм для тварин, борошно, пластівці, висівки, волокно, шкірку та оброблене насіння.

[0017] Інший спосіб, розкритий в цьому документі, являє собою спосіб отримання насінини,

яка містить сконструйований інсектицидний білок, що включає: висаджування щонайменше однієї насінини, яка містить сконструйований інсектицидний білок; вирощування рослин із зазначеної насінини; та збір насіння від рослин, причому зібрана насінини містить інсектицидний білок.

5 [0018] Ще один спосіб, розкритий в цій заявці, являє собою спосіб інгібування активності лускокрилих комах-шкідників від годування на культурній рослині, який включає модифікацію одного або більше амінокислотних залишків SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14 шляхом заміщення одного або більше амінокислотного(-их) залишку(-ів) для отримання модифікованої SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14; та забезпечення наявності інгібуючої по відношенню до лускокрилих кількості модифікованої SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14 всередині, на поверхні або поблизу тканин зазначеної культурної рослини; причому модифікований амінокислотний залишок SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14 вибраний з групи, що складається з серину в положенні 282, заміненого на лізин або валін, тирозину в положенні 316, заміненого на серин, ізолейцину в положенні 368, заміненого на пролін або аргінін, серину в положенні 374, заміненого на аргінін, аспарагіну в положенні 375, заміненого на гістидин та ізолейцину в положенні 432, заміненого на лейцин.

[0019] Також запропоновані рекомбінантні поліпептидні молекули, які кодуєть сконструйовані інсектицидні білки за цим винаходом. Розглянуті рекомбінантні поліпептидні молекули містять поліпептидну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 або SEQ ID NO: 41; і, необов'язково, поліпептидну послідовність, яка кодує агент, що має інгібіторну активність по відношенню до комах, відмінний від інсектицидного білка.

25 [0020] Інший спосіб, розкритий в цій заявці, являє собою спосіб збільшення активності по відношенню до лускокрилих і посилення спектра інгібування лускокрилих у каркасного білка, що включає модифікацію одного або більше амінокислотного(-их) залишку(-ів) SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14 шляхом заміщення амінокислотного(-их) залишку(-ів) для отримання сконструйованого інсектицидного білка, причому модифікований амінокислотний залишок SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 14 вибраний з групи, що складається з серину в положенні 282, заміненого на лізин або валін, тирозину в положенні 316, заміненого на серин, ізолейцину в положенні 368, заміненого на пролін або аргінін, серину в положенні 374, заміненого на аргінін, аспарагіну в положенні 375, заміненого на гістидин та ізолейцину в положенні 432, заміненого на лейцин. У деяких варіантах реалізації цього способу сконструйований інсектицидний білок має щонайменше у вісім разів збільшену летальність *Helicoverpa zea* в порівнянні з каркасним білком.

[0021] Інші варіанти реалізації, особливості та переваги цього винаходу будуть очевидні з наступного докладного опису, прикладів і формули винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

40 [0022] На Фіг. 1 представлені значення MIC50 (мінімальної інгібуючої концентрації) каркасного білка TIC844 (SEQ ID NO: 14), у порівнянні зі сконструйованим інсектицидним білком TIC844_8 (SEQ ID NO: 26) для двох різних колоній *Helicoverpa zea* (CEW) - «Union City» і «Benzon».

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

45 [0023] SEQ ID NO: 1 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1.
 [0024] SEQ ID NO: 2 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1.
 [0025] SEQ ID NO: 3 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1_3.
 [0026] SEQ ID NO: 4 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_3.
 [0027] SEQ ID NO: 5 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1_4.
 50 [0028] SEQ ID NO: 6 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_4.
 [0029] SEQ ID NO: 7 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1_5.
 [0030] SEQ ID NO: 8 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_5.
 [0031] SEQ ID NO: 9 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1_6.
 [0032] SEQ ID NO: 10 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_6.
 55 [0033] SEQ ID NO: 11 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок Cry1Da1_7.
 [0034] SEQ ID NO: 12 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_7.
 [0035] SEQ ID NO: 13 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844.
 60 [0036] SEQ ID NO: 14 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844.

- [0037] SEQ ID NO: 15 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_2.
 [0038] SEQ ID NO: 16 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_2.
 [0039] SEQ ID NO: 17 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_4.
 [0040] SEQ ID NO: 18 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_4.
 5 [0041] SEQ ID NO: 19 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_5.
 [0042] SEQ ID NO: 20 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_5.
 [0043] SEQ ID NO: 21 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_6.
 [0044] SEQ ID NO: 22 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_6.
 [0045] SEQ ID NO: 23 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_7.
 10 [0046] SEQ ID NO: 24 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_7.
 [0047] SEQ ID NO: 25 являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує білок TIC844_8.
 [0048] SEQ ID NO: 26 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_8.
 [0049] SEQ ID NO: 27 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1 в рослинах.
 15 [0050] SEQ ID NO: 28 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1.
 [0051] SEQ ID NO: 29 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_2.nno в рослинах.
 [0052] SEQ ID NO: 30 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_2.nno.
 20 [0053] SEQ ID NO: 31 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_3.nno в рослинах.
 [0054] SEQ ID NO: 32 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_3.nno.
 [0055] SEQ ID NO: 33 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_4.nno в рослинах.
 25 [0056] SEQ ID NO: 34 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_4.nno.
 [0057] SEQ ID NO: 35 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_5.nno в рослинах.
 30 [0058] SEQ ID NO: 36 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_5.nno.
 [0059] SEQ ID NO: 37 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_6.nno в рослинах.
 [0060] SEQ ID NO: 38 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_6.nno.
 35 [0061] SEQ ID NO: 39 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка Cry1Da1_7.nno в рослинах.
 [0062] SEQ ID NO: 40 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину Cry1Da1_7.nno.
 40 [0063] SEQ ID NO: 41 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка TIC844_9.nno в рослинах.
 [0064] SEQ ID NO: 42 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_9.nno.
 [0065] SEQ ID NO: 43 являє собою полінуклеотидну послідовність, сконструйовану для експресії білка TIC844_11.nno в рослинах.
 45 [0066] SEQ ID NO: 44 являє собою амінокислотну послідовність білкового токсину TIC844_11.nno.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

- [0067] У цьому документі представлені сконструйовані інсектицидні білки, що демонструють дивно вищі рівні токсичної активності проти видів ряду Лускокрилі і більш широкий інсектицидний спектр в порівнянні з іншими раніше відомими інсектицидними білками лускокрилих. Ці сконструйовані інсектицидні білки отримують з каркасних інсектицидних білків, які виступають в якості шаблонів для різних амінокислотних модифікацій. Приклади таких каркасних інсектицидних білків включають, але не обмежуються ними, Cry1Da1 і TIC844 (гомолог Cry1Da1). TIC844 містить основний токсин Cry1Da1 (тобто домени I, II та III) але використовує домен протоксину Cry1Ab3, для забезпечення гарної експресії в *Bacillus thuringiensis* (Bt). Експресія Cry1Da1 в Bt є поганою при використанні рідного домену протоксину Cry1Da1. Однак, як показано в цій заявці, експресія основного токсину Cry1Da1 помітно поліпшується в некрystalлоутворюючих штаммах Bt, коли видаляється нативний протоксиновий домен, а сегмент кодування основного токсину Cry1Da1 злитий з сегментом, що кодує
- 50
55
60

протоксиновий домен Cry1Ab3. Примітно, що білки TIC844 (SEQ ID NO: 14) і Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2) не демонструють комерційно корисний спектр інгібування лускокрилих і поліпшену інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих, що спостерігається у сконструйованих інсектицидних білків.

5 [0068] Сконструйовані інсектицидні білки, описані в цьому винаході, пов'язані з модифікаціями амінокислот, так що модифіковані білки мають поліпшений спектр інгібування лускокрилих і/або поліпшену інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих в порівнянні з вихідним каркасним білком TIC844 або Cry1Da1. Фрази «більш активний», «поліпшена активність», «підвищена специфічність», «підвищена токсична активність», «підвищена токсичність», «поліпшена інгібуюча активність по відношенню до лускокрилих», «більш висока інгібуюча активність по відношенню до лускокрилих» і «посилений спектр інгібування лускокрилих» відносяться до зіставлення активності сконструйованого інсектицидного білка з активністю каркасного білка (TIC844 або Cry1Da1) проти комахи-лускокрилого, причому активність, приписувана сконструйованому інсектицидному білку, більше, ніж активність, приписувана каркасному білку. У деяких варіантах реалізації винаходу інсектицидні білки, запропоновані в цьому документі, мають поліпшений спектр інгібування лускокрилих і/або поліпшену або більшу інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих в порівнянні з активністю каркасного білка TIC844 або Cry1Da1, причому види лускокрилих-шкідників включають, але не обмежуються ними, *Helicoverpa zea* і *Spodoptera frugiperda*.

20 [0069] Використовувані в цьому документі терміни і фрази «активний» або «активність»; «пестицидна активність» або «пестицидний»; або «інсектицидна активність», «інгібуюча інсектицидна активність», «інсектицидний» або «інсектицидно інгібуюча кількість», відносяться до ефективності токсичного агента, такого як інсектицидний білок, в інгібуванні (інгібуванні зростання, годування, плодючості або життєздатності), пригніченні (пригніченні росту, годування, плодючості або життєздатності), контролі (контролі зараження шкідниками, контролі активності годування шкідниками на певній культурі, що містить ефективну кількість описаного інсектицидного білка) або знищення (викликаючи захворюваність, смертність, або зниження плодючості) шкідника. Також «кількість, що надає інгібуючу активність на лускокрилих» відноситься до кількості токсичного агента, такого як інсектицидний білок, що призводить до будь-якого вимірного інгібування життєздатності лускокрилих, зростання лускокрилих, розвитку лускокрилих, розмноженню лускокрилих, кормової поведінки лускокрилих, шлюбної поведінки лускокрилих і/або будь-якого вимірного зниження несприятливих ефектів, які відчуває рослина від харчування лускокрилих. Ці терміни покликані включати результат забезпечення пестицидно ефективною кількістю токсичного агента для шкідника, при якому надання шкідника токсичного агента призводить до захворюваності, смертності, зниження плодючості або затримки росту. Ці терміни також включають відштовхування шкідника від рослини, тканини рослини, частини рослини, насінини, клітин рослини або від конкретного географічного положення, де рослина може виростати, в результаті надання пестицидно ефективною кількістю токсичного агента в або на рослині. Загалом, пестицидна активність відноситься до здатності токсичного агента бути ефективним в інгібуванні росту, розвитку, життєздатності, кормової поведінки, кормової поведінки, плодючості або будь-якого вимірного зниження, викликаного несприятливими ефектами, в зв'язку з наданням в раціон комахи цього білка, фрагмента білка, сегмента білка або полінуклеотиду, конкретному цільовому шкіднику, включаючи, але не обмежуючись ними, комах ряду *Lepidoptera*. Токсичний агент може бути продукований рослиною або може бути застосований до рослини або в навколишньому середовищі в тому місці, де знаходиться рослина.

[0070] Пестицидно ефективна кількість токсичного агента, якщо вона передбачена в раціоні цільового шкідника, проявляє пестицидну активність, коли токсин потрапляє в організм шкідника. Токсичний агент може являти собою пестицидний білок, або один або більше хімічних агентів, відомих в цій області техніки. Пестицидні або інсектицидні хімічні агенти та пестицидні або інсектицидні білкові агенти можуть бути використані окремо або в поєднанні один з одним. Хімічні агенти включають, але не обмежуються ними, молекули дцРНК, націлені на специфічні гени для пригнічення в цільовому шкіднику, органохлориди, органофосфати, карбамати, піретроїди, неонікотиноїди та ріаноїди. Пестицидні або інсектицидні білкові агенти включають сконструйовані інсектицидні білки, представлені в цій заявці, а також інші білкові токсичні агенти, включаючи ті, які націлені на різновиди лускокрилих, а також білкові токсини, які використовуються для боротьби з іншими шкідниками рослин, такі як білки Cry, доступні в цій області техніки для застосування при боротьбі з видами рядів *Coleoptera*, *Hemiptera* та *Homoptera*.

60 [0071] Термін «сегмент» або «фрагмент» використовується в цьому документі для опису

послідовностей амінокислот або нуклеїнових кислот, які коротше, ніж повна амінокислотна або нуклеотидна послідовність, яка описує сконструйовані інсектицидні білки.

[0072] Передбачається, що згадка шкідника, особливо шкідника сільськогосподарської рослини, означає комах-шкідників культурних рослин, особливо тих лускокрилих комах-шкідників, які контролюються описаними інсектицидними білками. Однак згадка шкідника може також включати комах-шкідників рядів Coleoptera (Твердокрили), Hemiptera (Напівтвердокрили) та Homoptera (Равнокрили), а також нематод і гриби, в разі, якщо токсичні агенти, націлені на цих шкідників, спільно локалізуються або присутні разом з описаними інсектицидними білками.

[0073] Розкриті сконструйовані інсектицидні білки проявляють інсектицидну активність по відношенню до комах-шкідників з видів комах ряду Лускокрилі, включаючи імаго, лялечок, личинок та новонароджених. Комахи ряду Lepidoptera, включають, без обмежень, совок лугових, совок, листокруток, і совок з родини Noctuidae, наприклад, кукурудзяну листову совку (*Spodoptera frugiperda*), совку малу (*Spodoptera exigua*), совку латукову (*Mamestra configurata*), совку-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустяну (*Trichoplusia ni*), соєву совку (*Pseudoplusia includens*), совку оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatalis*), совку конюшинову (*Hypena scabra*), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), совку бавовняну (*Agrotis subterranea*), совку лугову (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямокутну (*Agrotis orthogonia*); точильників, чехлоносок, метеликів, вогнівок шишкових, гусениць метелика капустянки та піроморфід з родини Pyralidae, наприклад, метелика стеблового кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), метелика-вогнівку (*Amyelois transitella*), кукурудзяну вогнівку (*Crambus caliginosellus*), лугового метелика (*Herpetogramma licarsisalis*), вогнівку соняшникову (*Homoeosoma electellum*), точильника зернового кукурудзяного (*Elasmopalpus lignosellus*); листокруток, димчастих листокруток, плодожерок і плодкових листокруток з родини Tortricidae, наприклад, плодожерки яблуні (*Cydia pomonella*), листовійку виноградну (*Endopiza viteana*), листовійку східну персикову (*Grapholita molesta*), листовійку соняшнику (*Suleima helianthana*); і багатьох інших економічно важливих представників ряду Lepidoptera, наприклад, капустяну міль (*Plutella xylostella*), рожевого коробкового хробака (*Pectinophora gossypiella*) і шовкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Інші комахи-шкідники ряду Lepidoptera включає, наприклад, *Alabama argillacea* (совка бавовняна американська), *Archips argyrospila* (листовійка плодкових дерев), *Archips rosana* (листовійка різана золотиста) та інші види *Archips*, *Chilo suppressalis* (вогнівка азіатська стеблова або жовта рисова вогнівка), *Snaphalocrocis medinalis* (листовійка рисова), *Crambus caliginosellus* (кукурудзяна вогнівка), *Crambus teterrellus* (метелик трав'яний), *Diatraea grandiosella* (вогнівка кукурудзяна південно-західна), *Diatraea saccharalis* (вогнівка цукрової тростини), *Earias insulana* (совка бавовняна єгипетська), *Earias vittella* (совка плямиста), *Helicoverpa armigera* (совка американська), *Helicoverpa zea* (совка бавовняна або американська кукурудзяна совка), *Heliothis virescens* (тютюнова листовійка), *Herpetogramma licarsisalis* (луговий метелик), *Lobesia botrana* (листовійка гронова), *Phyllocnistis citrella* (цитрусова мінующая моль), *Pieris brassicae* (білявка капустяна), *Pieris rapae* (ріпниця або білявка ріпнака), *Plutella xylostella* (капустяна моль), *Spodoptera exigua* (совка мала), *Spodoptera litura* (азіатська бавовникова совка, азіатська бавовняна совка) та *Tuta absoluta* (пасльоновий мінер).

[0074] Зазначена в цій заявці «виділена молекула ДНК» або еквівалентний термін або фраза означає, що молекула ДНК являє собою молекулу ДНК, яка присутня окремо або в поєднанні з іншими композиціями, але не в її природному середовищі. Наприклад, елементи нуклеїнової кислоти, такі як кодуєча послідовність, інтронна послідовність, нетрансльована лідерна послідовність, промоторна послідовність, послідовність термінації транскрипції і т.п., які, природно, знаходяться в ДНК геному організму, не вважаються «виділеними» до тих пір, поки елемент знаходиться в геномі організму та в тому місці, де він знаходиться, в природному геномі. Проте, кожен з цих елементів та їх частини були б «виділеними» в рамках цього опису, якщо елемент не знаходиться всередині геному організму та в тому місці, де він знаходиться, в геномі, в якому він природним чином знаходиться. Саме так нуклеотидна послідовність, що кодує інсектицидний білок або будь-який інсектицидний варіант цього білка, який зустрічається в природі, буде являти собою виділену нуклеотидну послідовність, якщо нуклеотидна послідовність не перебуває у ДНК бактерії, в якій природним чином знаходиться послідовність, що кодує білок. Синтетична нуклеотидна послідовність, що кодує амінокислотну послідовність природного інсектицидного білка, буде вважатися виділеною для цілей цього опису. Для цілей цього опису будь-яка трансгенна нуклеотидна послідовність, тобто нуклеотидна послідовність ДНК, вбудована в геном клітин рослини або бактерії, або присутня у позакромосомному векторі, буде вважатися виділеною нуклеотидною послідовністю незалежно від того, чи присутня вона в плазміді або подібній структурі, використовуваній для трансформації клітин, в геномі рослини або бактерії, або присутній в кількостях, які виявляються в тканинах, потомстві, біологічних

зразках або матеріалах, отриманих з рослини або бактерії.

[0075] Як описано далі в Прикладах, цикли конструювання, тестування і відбору, що повторюються, понад двох тисяч (2000) варіантів амінокислотної послідовності TIC844 і Cry1Da1 привели до ідентифікації певних амінокислотних залишків, які можуть бути заміщені, вставлені або видалені з цього каркасного білка для отримання штучних інсектицидних білків, які мають розширений спектр інгібування лускокрилих і/або поліпшену інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих (тобто більш токсичним; менша кількість інсектицидного білка, необхідно для отримання того ж рівня смертності) в порівнянні зі спектром і активністю базових каркасних білків, TIC844 або Cry1Da1. Ці повторювані етапи конструювання, тестування та відбору також привели до ідентифікації заміщень, вставок або делецій нейтральних амінокислотних залишків в каркасних білках TIC844 і Cry1Da1, які не змінюють інгібуючий спектр або активність по відношенню до комах. Конкретні амінокислотні залишки в каркасі TIC844 і Cry1Da1, які можуть бути модифіковані для отримання поліпшеного спектра інгібування лускокрилих і/або поліпшеної інгібуючої активності по відношенню до лускокрилих, у порівнянні з TIC844 або Cry1Da1, ідентифіковані в цьому документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйований інсектицидний білок, запропонований в цьому документі може проявляти приблизно восьмикратну або велику інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих проти видів шкідників ряду Лускокрилі, в порівнянні з каркасним білком SEQ ID NO: 14 (TIC844) або SEQ ID NO: 2 (Cry1Da1).

[0076] Термін «конструювання» в цих циклах включав визначення релевантних залишків в каркасному білку для модифікації з метою створення модифікованого тестового білка і клонування та експресію отриманих модифікованих тестових білків. Атомарна структура каркасних білків була використана для наведення та доповнення напіввипадкових підходів до вибору амінокислотних залишків для модифікації при конструюванні. Термін «тестування» в цих циклах включав порівняння видоспецифічності видових активностей модифікованого тестового білка з його вихідним каркасним білком. Термін «відбір» в цих циклах включав ідентифікацію модифікованих тестових білків з поліпшеною активністю (поліпшені варіанти) і відповідних залишків, які були сконструйовані для створення цих поліпшених варіантів (ці поліпшені варіанти називаються в цьому документі «сконструйованими інсектицидними білками»).

[0077] Прикладами способів тестування і відбору сконструйованих інсектицидних білків є введення однакових кількостей модифікованого тестового білка і каркасного білка (TIC844 або Cry1Da1) комасі-шкіднику в контрольованих умовах аналізу і вимірювання, та порівняння ефективності модифікованих тестових білків і каркасних білків. Інший спосіб тестування і відбору сконструйованих інсектицидних білків включає визначення доз білка (наприклад, концентрації білка в раціоні) модифікованого тестового білка і каркасного білка (TIC844 або Cry1Da1), які викликають еквівалентні відповіді популяції комах в контрольованих умовах аналізу (тобто, отримання кривої залежності доза-ефект). Для порівняння використовувалася статистично значуща величина дози, яка використовується для порівняння: середня смертельна концентрація (LC50), необхідна для знищення 50 % досліджуваної популяції або концентрації інгібування ліньки («MIC50»), медіанна концентрація, необхідна для пригнічення ліньки на 50 %).

[0078] У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйовані інсектицидні білки, описані в цьому документі, містять щонайменше одну амінокислотну модифікацію в наступних відносних положеннях TIC844 (SEQ ID NO: 14) або Cry1Da1 (SEQ ID NO: 2): серин в положенні 282 замінений на лізин або валін, тирозин в положенні 316 замінений на серин, ізолейцин в положенні 368 замінений на пролін або аргінін, серин в положенні 374 замінений на аргінін, аспарагін в положенні 375 замінений на гістидин та ізолейцин в положенні 432 замінений на лейцин. Сконструйовані інсектицидні білки можуть також містити щонайменше дві, три, чотири або більше з цих амінокислотних замінів або делецій в рамках однієї і тієї ж сконструйованої інсектицидної послідовності білка.

[0079] Сконструйовані інсектицидні білки, які містять ці амінокислотні модифікації, включають білки, представлені як SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 44, та їх фрагменти, що мають інгібуючу активність по відношенню до комах. Кожен з цих сконструйованих інсектицидних білків має виміряну масу близько 132 кДа. Окремі характеристики інсектицидних каркасних білків TIC844 і Cry1Da1 і сконструйованих інсектицидних білків, отриманих з них, представлені в Таблиці 1.

Характеристики TIC844, Cry1Da1 і сконструйованих інсектицидних білків.

Білок (Назва/SEQ ID NO.)	Молекулярна маса(у дальтонах)	Амінокислотна довжина	Ізоелектрична точка	Заряд при pH 7,0	Кількість сильнопозитивних (-) амінокислот	Кількість сильнонегативних амінокислот	Кількість гідрофобних амінокислот	Кількість полярних амінокислот
Cry1Da1/NO: 2	132481,87	1165	5,087	-39,319	113	156	388	347
Cry1Da1_3/NO: 4	132405,77	1165	5,087	-39,318	113	156	388	347
Cry1Da1_4/NO: 6	132550,98	1165	5,112	-38,319	114	156	388	346
Cry1Da1_5/NO: 8	132448,80	1165	5,112	-38,318	114	156	387	347
Cry1Da1_6/NO: 10	132430,82	1165	5,112	-38,319	114	156	387	346
Cry1Da1_7/NO: 12	132401,78	1165	5,087	-39,318	113	156	388	346
TIC844/NO: 14	129182,91	1 139	5,026	-39,540	110	153	382	340
TIC844_2/NO: 16	129129,85	1 139	5,048	-39,373	110	153	382	339
TIC844_4/NO: 18	129106,81	1 139	5,026	-39,539	110	153	382	340
TIC844_5/NO: 20	1291118,08	+1069	5,325	-27,535	105	136	363	321
TIC844_6/NO: 22	129252,02	1 139	5,050	-38,540	111	153	382	339
TIC844_7/NO: 24	129149,84	1 139	5,050	-38,539	111	153	381	340
TIC844_8/NO: 26	129102,82	1 139	5,026	-39,539	110	153	382	339
Cry1Da1/NO: 28	132481,87	1165	5,087	-39,319	113	156	388	347
Cry1Da1_2.nno/NO: 30	132552,95	1166	5,087	-39,319	113	156	389	347
Cry1Da1_3.nno/NO: 32	132476,85	1166	5,087	-39,318	113	156	389	347
Cry1Da1_4.nno/NO: 34	132622,06	1166	5,112	-38,319	114	156	389	346
Cry1Da1_5.nno/NO: 36	132519,88	1166	5,112	-38,318	114	156	388	347
Cry1Da1_6.nno/NO: 38	132501,90	1166	5,112	-39,319	114	156	388	346
Cry1Da1_7.nno/NO: 40	132472,86	1166	5,087	-39,318	113	156	389	346
TIC844_9.nno/NO: 42	129253,99	1140	5,026	-39,540	110	153	383	340
TIC844_11.nno/NO: 44	129173,90	1140	5,026	-39,539	110	153	383	339

5 [0080] Фрагменти сконструйованих інсектицидних білків, описаних в цьому документі, можуть бути скороченими формами, в яких одна або кілька амінокислот видаляються з N-кінця, C-кінця, середини білка, або їх комбінацій без втрати інгібуючої активності по відношенню до комах. Ці фрагменти повинні зберігати інгібуючу активність батьківського інсектицидного білка по відношенню до комах.

10 [0081] Білки, які мають схожість зі сконструйованими інсектицидними білками, можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння один з одним з використанням різних комп'ютерних алгоритмів, відомих в цій області техніки. Наприклад, ідентичність амінокислотних послідовностей білків, зв'язаних зі сконструйованими білками, може бути проаналізована з використанням вирівнювання Clustal W з використанням цих параметрів за замовчуванням: Матриця вагових оцінок: blosum, штраф на внесення делеції в вирівнювання: 10,0, штраф на продовження делеції: 0,05, гідрофільні делеції: Увімкн., Гідрофільні залишки: GPSNDQERK, штраф на залишкоспецифічні делеції: Увімкн. (Thompson, et al (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Відсоток ідентичності амінокислот далі розраховують у вигляді виразу 100 % помножених на (ідентичності амінокислот/довжина бажаного білка). Інші алгоритми вирівнювання також доступні в цій області техніки і забезпечують результати, аналогічні тим, які

отримані з використанням вирівнювання Clustal W.

[0082] Як описано далі в прикладах цієї заявки, синтетичні або штучні послідовності, що кодують каркасні білки і сконструйовані інсектицидні білки, були розроблені для застосування в рослинах. Ілюстративні синтетичні нуклеотидні послідовності, які були розроблені для застосування у рослин, викладені в SEQ ID NO: 27 (Cry1Da1.nno), SEQ ID NO: 29 (Cry1Da1_2.nno), SEQ ID NO: 31 (Cry1Da1_3.nno), SEQ ID NO: 33 (Cry1Da1_4.nno), SEQ ID NO: 35 (Cry1Da1_5.nno), SEQ ID NO: 37 (Cry1Da1_6.nno), SEQ ID NO: 39 (Cry1Da1_7.nno), SEQ ID NO: 41 (TIC844_9.nno) і SEQ ID NO: 43 (TIC844_11.nno).

[0083] Експресійні касети та вектори, що містять ці синтетичні або штучні нуклеотидні послідовності, конструювали та вводили в клітини рослин кукурудзи, бавовнику та сої відповідно до способів та методик трансформації, відомих в цій галузі техніки. Трансформовані клітини регенерували в трансформовані рослини, які, як було відмічено, експресували сконструйований інсектицидний білок або каркасний білок. Для перевірки пестицидної активності біотести проводили в присутності личинок лускокрилих-шкідників з використанням висічок з листя рослин, отриманих від трансформованих рослин.

[0084] Розглядаються композиції молекул рекомбінантної нуклеїнової кислоти, які кодують сконструйовані інсектицидні білки. Наприклад, сконструйований інсектицидний білок може бути експресованим конструктами рекомбінантної ДНК, в яких полінуклеотидна молекула з ВРЗ (відкритою рамкою зчитування), що кодує сконструйований інсектицидний білок, функціонально зв'язана з елементами генетичної експресії, такими як промотор і будь-який інший регуляторний елемент, необхідний для експресії в системі для якої призначений цей конструкт. Необмежуючі приклади включають рослинний функціональний промотор, функціонально зв'язаний з кодуючими послідовностями синтетичних інсектицидних білків, для експресії сконструйованого інсектицидного білка в рослинах, або Vt-функціональний промотор, функціонально зв'язаний з кодуючими послідовностями синтетичних інсектицидних білків, для експресії білка в бактерії Vt або інших видах роду *Bacillus*. Інші елементи можуть бути функціонально зв'язані зі сконструйованими кодуючими послідовностями інсектицидного білка, включаючи, але не обмежуючись ними, енхансери, інтрони, нетрансльовані лідери, кодовані білкові імобілізаційні мітки (гистидинові мітки), транслокаційні пептиди (тобто пластидні транзитні пептиди, сигнальні пептиди) поліпептидні послідовності для посттрансляційних модифікуючих ферментів, сайти зв'язування рибосом і сайти-мішені РНКі. Наведені в цьому документі ілюстративні молекули рекомбінантного полінуклеотида включають, але не обмежуються ними, гетерологічний промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, таким як SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 b SEQ ID NO: 43, який кодує поліпептид або білок, який має амінокислотну послідовність, зазначену в SEQ ID NO: 4 (Cry1Da1_3), SEQ ID NO: 6 (Cry1Da1_4), SEQ ID NO: 8 (Cry1Da1_5), SEQ ID NO: 10 (Cry1Da1_6), SEQ ID NO: 12 (Cry1Da1_7), SEQ ID NO: 16 (TIC844_2), SEQ ID NO: 18 (TIC844_4), SEQ ID NO: 20 (TIC844_5), SEQ ID NO: 22 (TIC844_6), SEQ ID NO: 24 (TIC844_7), SEQ ID NO: 26 (TIC844_8), SEQ ID NO: 32 (Cry1Da1_3.nno), SEQ ID NO: 34 (Cry1Da1_4.nno), SEQ ID NO: 36 (Cry1Da1_5.nno), SEQ ID NO: 38 (Cry1Da1_6.nno), SEQ ID NO: 40 (Cry1Da1_7.nno) і SEQ ID NO: 44 (TIC844_11.nno). Гетерологічний промотор також може бути функціонально зв'язаний з синтетичними кодуючими послідовностями ДНК, що кодують націлений на пластид сконструйований інсектицидний білок і нецільовий сконструйований інсектицидний білок. Передбачається, що кодони молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує сконструйований інсектицидний білок, описаний в цьому документі, можуть бути заміщені синонімічними кодонами (відомими в цьому рівні техніки як мовчазна заміна).

[0085] Рекомбінантна молекула ДНК або конструкт, що містять сконструйовану інсектицидну послідовність, що кодує білок, може додатково містити область ДНК, яка кодує один або більше токсичних агентів, які можуть бути налаштовані для одночасної експресії або коекспресії з послідовністю ДНК, що кодує сконструйований інсектицидний білок, білок, відмінний від сконструйованого інсектицидного білка, молекулу дцРНК, що має інгібуючу активність по відношенню до комах або допоміжний білок. Допоміжні білки включають, але не обмежуються ними, кофактор, ферменти, партнери по зв'язуванню або інші агенти, які діють, з метою підвищення ефективності агента, який надає інгібуючий вплив на комах, наприклад, шляхом полегшення його експресії, впливу на його стабільність в рослинах, оптимізації вільної енергії для олігомеризації, збільшуючи його токсичність і збільшуючи спектр його активності. Допоміжний білок може полегшувати захоплення одного або більше агентів, що мають інгібуючий вплив на комах, наприклад, або посилювати токсичний ефект токсичного агента.

[0086] Рекombінантну молекулу ДНК або конструкт можна сформувати так, щоб всі білки або молекули дцРНК експресувалися від одного промотора, або кожен білок, або молекула дцРНК перебувала під контролем окремого промотора, або деякої їх комбінації. Білки за винаходом можуть бути експресовані системою множинної експресії генів, в якій сконструйований інсектицидний білок експресується із загального нуклеотидного сегмента, який також містить інші відкриті рамки зчитування і промотори, в залежності від обраного типу системи експресії. Наприклад, бактеріальна система множинної експресії генів може використовувати єдиний промотор для керування експресією багатократнозв'язаних/тандемних відкритих рамок зчитування з одного оперону (тобто, поліцистронної експресії). В іншому прикладі рослинна система множинної експресії генів може використовувати багатократнозв'язані експресійні касети, кожна з яких експресує інший білок або інший токсичний агент, такий як одна або більше молекул дцРНК.

[0087] Рекombінантні молекули нуклеїнової кислоти або рекombінантні конструкти ДНК, що містять сконструйовану послідовність, що кодує інсектицидний білок, можуть бути доставлені в клітини-хазяї за допомогою векторів, наприклад, плазмідного, бакуловірусного, синтетичної хромосоми, віріону, космідного, фагмідного, фагового або вірусного вектора. Такі вектори можуть бути використані для досягнення стабільної або короточасної експресії сконструйованої послідовності, що кодує інсектицидний білок в клітині-хазяїні або подальшої експресії кодованого поліпептиду. Екзогенний рекombінантний полінуклеотид або рекombінантний конструкт ДНК, які містять сконструйовану інсектицидну послідовність, що кодує послідовність білка, і які вводять в клітину-хазяїна, згадуються в цьому документі як «трансген».

[0088] У цьому документі запропоновано трансгенні бактерії, трансгенні клітини рослин, трансгенні рослини і трансгенні частини рослин, які містять полінуклеотид, що кодує будь-який один або більше інсектицидних білків. Термін «бактеріальна клітина» або «бактерія» може включати, але не обмежується ними, клітину видів родів *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* або *Rhizobium*. Термін «клітина рослини» або «рослина» може включати, але не обмежується ними, клітину дводольної рослини або клітину однодольної рослини. Розглянуті рослини і клітини рослин включають, але не обмежуються ними, люцерну, банан, ячмінь, боби, брокколі, капусту, капусту декоративну, моркву, маніок, рицину, капусту кольорову, селеру, нут, капусту пекінську, цитрусові, кокосовий горіх, каву, кукурудзу, конюшину, бавовник, гарбузові, огірок, сосну Дугласа, баклажан, евкаліпт, льон, часник, виноград, хміль, цибулю-порей, салат латук, сосну Лоболі, просо, дині, горіх, овес, маслину, цибулю, декоративні рослини, пальму, пасовищну траву, горох, арахіс, перець, голубиний горох, сосну, картоплю, тополю, гарбуз, сосну променисту, редис, рапс, рис, кореневищні злаки, жито, сафлор, чагарникові троянди, сорго, сосну південну, сою, шпинат, гарбуз гігантський, полуницю, цукровий буряк, цукрову тростину, соняшник, кукурудзу цукрову, ліквідамбар смолоносний, солодку картоплю, просо, чай, тютюн, томат, тритікале, дернову траву, кавун і клітину або рослину пшениці. У деяких варіантах реалізації винаходу представлені трансгенні рослини і трансгенні частини рослин, одержані з трансгенної клітини рослини. У деяких варіантах реалізації винаходу трансгенні рослини можуть бути отримані з трансгенної насінини, шляхом живцювання, відщипування, подрібнення або іншим способом роз'єднання частини з рослиною. У деяких варіантах реалізації винаходу частина рослини може являти собою насінину, коробочку, лист, квітку, стебло, корінь або будь-яку їх частину або частину трансгенної частини рослини, яка регенерується. Використовуваний в цьому контексті термін частина трансгенної частини рослини, «яка не регенерується» є частиною, з якої не може бути індуковано утворення цілої рослини, або з якої не може бути індуковано утворення цілої рослини, здатної до статевого і/або вегетативного розмноження. У деяких варіантах реалізації винаходу частина частини рослини, яка не регенерується, являє собою частину трансгенної насінини, коробочки, листа, квітки, стебла або кореня.

[0089] Запропоновано способи отримання трансгенних рослин, які містять лускокрило-інгібуючі кількості сконструйованих інсектицидних білків. Такі рослини можуть бути отримані шляхом введення полінуклеотиду, який кодує сконструйовані інсектицидні білки, запропоновані в цій заявці, в рослинну клітину, та відбору рослини (отриманої із зазначеної рослинної клітини), яка експресує інсектицидно- або лускокрило-інгібуючу кількість сконструйованого білка. Рослини можуть бути отримані з клітин рослин шляхом регенерації або завдяки методикам трансформації насіння, пилку або меристеми. Способи трансформації рослин відомі в цій області техніки.

[0090] Рослини, які експресують сконструйовані інсектицидні білки, можна схрещувати шляхом селекції з трансгенними трансформантами, які експресують інші інсектицидні білки і/або експресують інші трансгенні ознаки, такі як інші ознаки боротьби з комахами, гени стійкості до

гербіцидів, гени, що дають ознаки врожайності або стійкості до стресу, і т.п., або ці риси можуть бути об'єднані в один вектор, так щоб всі ознаки були зв'язані між собою.

[0091] Оброблені рослинні продукти, що містять кількість (придатну для виявлення) сконструйованого інсектицидного білка, сегмент, що має інгібуючу активність по відношенню до комах або його фрагмент, або будь-яка відмінна його частина, також описані в цій заявці. У деяких варіантах реалізації винаходу оброблений продукт вибраний з групи, що складається з частин рослини, біомаси рослини, олії, борошна грубого помелу, цукру, корму для тварин, борошна, пластівців, висівок, волокна, лушпиння, обробленого насіння та насіння. У деяких варіантах реалізації винаходу, оброблений продукт являє собою той, що не здатен регенеруватися. Рослинний продукт може містити матеріал або інші комерційні продукти, отримані з трансгенної рослини або трансгенної частини рослини, причому матеріал або інші продукти можуть бути відслідковані за допомогою комерційної діяльності шляхом виявлення нуклеотидних сегментів або РНК, яка експресувалася, або білка, які кодують або містять відмінні частини сконструйованого інсектицидного білка.

[0092] Способи боротьби з комахами, зокрема ураження видами ряду *Lepidoptera*, культурних рослин, зі сконструйованими інсектицидними білками, також описані в цій заявці. Такі способи можуть включати вирощування рослин, що містять інсектицидно- або лускокрило-інгібуючу кількість сконструйованого інсектицидного білка. У деяких варіантах реалізації винаходу такі способи можуть додатково включати одне або більше з наступного: (i) застосування будь-якої композиції, яка містять або кодує сконструйований інсектицидний білок, до рослини або насінини, що призводить до утворення рослини; і (ii) трансформацію рослини або клітини рослини, що призводить до утворення рослини з полінуклеотидом, що кодує сконструйований інсектицидний білок. Загалом, передбачається, що сконструйований інсектицидний білок може бути забезпечений в композиції, забезпечений в мікроорганізмі, забезпечений в трансгенній рослині для додання інгібуючої активності по відношенню до комах ряду *Lepidoptera*.

[0093] У деяких варіантах реалізації винаходу, сконструйований інсектицидний білок являє собою інсектицидно активний інгредієнт композиції, яка має інгібуючу активність по відношенню до комах, отриману шляхом культивування рекомбінантної *Bacillus* або будь-якої іншої рекомбінантної бактеріальної клітини, трансформованої, для експресії сконструйованого інсектицидного білка в умовах, придатних для експресії. Така композиція може бути одержана за допомогою висушування, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, осадження або концентрації культури таких рекомбінантних клітин, що експресують/продукують сконструйований інсектицидний білок. Такий процес може привести до утворення екстракту бактеріальних клітин, суспензії клітин, клітинного гомогенату, клітинного лізату, клітинного супернатанту, клітинного фільтрату або осадження клітин *Bacillus* або іншого ентомопатогену. Отримавши сконструйований інсектицидний білок, таким чином створюють, композицію, яка містить сконструйований інсектицидний білок, може містити бактеріальні клітини, бактеріальні спори, а також параспоральні тільця, і може поставлятися для різних застосувань, включаючи продукти-спреї, що мають інгібуючу активність по відношенню до сільськогосподарських комах або препарати кормової біомаси, що мають інгібуючу активність по відношенню до комах в кормових біотестах.

[0094] В одному варіанті реалізації винаходу, для того, щоб зменшити ймовірність розвитку стійкості, композиція або трансгенні рослини, що мають інгібуючу активність по відношенню до комах, які містять сконструйований інсектицидний білок можуть додатково містити щонайменше один додатковий токсичний агент, який проявляє інгібуючу активність по відношенню до одних і тих же видів лускокрилих комах, але який відрізняється від сконструйованого інсектицидного білка. Можливі додаткові токсичні агенти для такої композиції включають молекули білка, що має інгібуючу активність по відношенню до комах і молекулу дцРНК, що має інгібуючу активність по відношенню до комах. Одним із прикладів використання таких рибонуклеотидних послідовностей для боротьби з комахами-шкідниками описані в Baum, et al. (Патентна публікація США 2006/0021087 A1). Такий додатковий поліпептид(и) для боротьби з лускокрилими комахами-шкідниками може бути вибраний з групи, що складається з білка, який проявляє інгібуючу активність по відношенню до комах, такого як, але не обмежуючись ними, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (патентна публікація США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), Cry1D, Cry1E, Cry1F і химери Cry1A/F (патент США № 7070982, 6962705 та 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (патент США № 7064249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, VIP3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, і AXMI-045 (патентна публікація США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58,

АХМІ-88, АХМІ-97, АХМІ-102, АХМІ-112, АХМІ-117, АХМІ-100 (патентна публікація США 2013-0310543 А1), АХМІ-115, АХМІ-113, АХМІ-005 (патентна публікація США 2013-0104259 А1), АХМІ-134 (патентна публікація США 2013-0167264 А1), АХМІ-150 (патентна публікація США 2010-0160231 А1), АХМІ-184 (патентна публікація США 2010-0004176 А1), АХМІ-196, АХМІ-204, АХМІ-207, АХМІ-209 (патентна публікація США 2011-0030096 А1), АХМІ-218, АХМІ-220 (патентна публікація США 2014-0245491 А1), АХМІ-221z, АХМІ-222z, АХМІ-223z, АХМІ-224z, АХМІ-225z (патентна публікація США 2014-0196175 А1), АХМІ-238 (патентна публікація США 2014-0033363 А1), АХМІ-270 (патентна публікація США 2014-0223598 А1), АХМІ-345 (патентна публікація США 2014-0373195 А1), DIG-3 (патентна публікація США 2013-0219570 А1), DIG-5 (патентна публікація США 2010-0317569 А1), DIG-11 (патентна публікація США 2010-0319093 А1), AfIP- 1A і його похідні (патентна публікація США 2014-0033361 А1), AfIP-1B і його похідні (патентна публікація США 2014-0033361 А1), PIP-1A/PIIP-1B (патентна публікація США 2014-0007292 А1), PSEEN3174 (патентна публікація США 2014-0007292 А1), AECFG-592740 (патентна публікація США 2014-0007292 А1), Pput_1063 (патентна публікація США 2014-0007292 А1), Pput_1064 (патентна публікація США 2014-0007292 А1), GS-135 і його похідні (патентна публікація США 2012-0233726 А1), GS153 і його похідні (патентна публікація США 2012-0192310 А1), GS154 і його похідні (патентна публікація США 2012-0192310 А1), GS155 і його похідні (патентна публікація США 2012-0192310 А1), SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2012-0167259 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2012-0047606 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2011-0154536 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2011-0112013 А1, SEQ ID NO: 2 і 4, та їх похідні, як описано в патентній публікації США 2010-0192256 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2010-0077507 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2010-0077508 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патентній публікації США 2009-0313721 А1, SEQ ID NO: 2 або 4, та їх похідні, як описано в патентній публікації США 2010-0269221 А1, SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патенті США № 7772465 (B2), CF161_0085 та його похідні як описано в WO2014/008054 A2, токсичні білки, що мають активність по відношенню до лускокрилих та їх похідні, як описано в патентних публікаціях США US2008-0172762 А1, US2011-0055968 А1 та US2012-0117690 А1; SEQ ID NO: 2, та її похідні, як описано в US7510878 (B2), SEQ ID NO: 2 та її похідні, як описано в патенті США № 7812129 (B1); і тому подібне.

[0095] В інших варіантах реалізації винаходу, композиція або трансгенна рослина, що має інгібуючу активність по відношенню до комах, можуть додатково містити щонайменше один додатковий токсичний агент, який проявляє інсектицидну інгібуючу активність по відношенню до комах-шкідників, які не сприйнятливі до інгібуючої активності сконструйованих інсектицидних білків за цим винаходом (наприклад, жорстокрилих, напівжорстокрилих і прямокрилих шкідників), для розширення отриманого спектра інгібуючої активності по відношенню до комах.

[0096] Такий додатковий токсичний агент для боротьби з жорстокрилимими комахами-шкідниками може бути вибраний з групи, що складається з білка, що має інгібуючу активність по відношенню до комах, такого як, але не обмежуючись цим, Cry3Bb (патент США 6501009), варіанти Cry1C, варіанти Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, АХМІ134 (патентна публікація США 2013-0167264 А1) АХМІ-184 (патентна публікація США 2010-0004176 А1), АХМІ-205 (патентна публікація США 2014-0298538 А1), ахмі207 (патентна публікація США 2013-0303440 А1), АХМІ-218, АХМІ-220 (патентна публікація США 20140245491 А1), АХМІ-221z, АХМІ-223z (патентна публікація СШ 2014-0196175 А1), АХМІ-279 (патентна публікація США 2014-0223599 А1), АХМІ-R1 і їх варіанти (патентна публікація США 2010-0197592 А1), TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (патентна публікація США 2010-0319092 А1), eNIPs (публікація заявки на патент США № 2010/0017914), IP3, і його варіанти (патентна публікація США 2012-0210462 А1) і \square -Hexatoxin-Hv1a (публікація заявки на патент США US2014-0366227 А1).

[0097] Такий додатковий токсичний агент для боротьби з напівжорстокрилимими шкідниками може бути вибраний з групи, що складається з білків, що мають активність по відношенню до напівжорстокрилих, таких як, але не обмежуючись ними, TIC1415 (патентна публікація США 2013-0097735 А1), TIC807 (патент США № 8609936), TIC834 (патентна публікація США 2013-0269060 А1), АХМІ-036 (патентна публікація США 2010-0137216 А1) і АХМІ-171 (патентна публікація США 2013-0055469 А1). Додаткові поліпептиди для боротьби з жорстокрилимими, лускокрилимими і напівжорстокрилимими комахами-шкідниками можна знайти на сайті номенклатури токсину *Bacillus thuringiensis* підтримуваному Neil Crickmore (в Інтернеті, за адресою btnomenclature.info).

[0098] Кодуючі послідовності сконструйованого інсектицидного білка та послідовності, які

мають значний відсоток ідентичності зі сконструйованими інсектицидними білками можуть бути ідентифіковані з використанням способів, відомих фахівцям в цій області техніки, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), термічна ампліфікація та гібридизація. Наприклад, сконструйовані інсектицидні білки можуть бути використані для отримання антитіл, які специфічно зв'язуються з родинними білками, і можуть бути використані для скринінгу і пошуку інших тісно пов'язаних білків.

[0099] Крім того, нуклеотидні послідовності, що кодують сконструйовані інсектицидні білки, можуть бути використані в якості зондів і праймерів для скринінгу з метою виявлення інших представників класу з використанням методів термічного циклу або ізотермічної ампліфікації та гібридизації. Наприклад, олігонуклеотиди, отримані з послідовностей, зазначених в SEQ ID NO: 3 можуть бути використані, для визначення наявності або відсутності сконструйованого інсектицидного трансгену в зразку дезоксирибонуклеїнової кислоти, отриманому з матеріалу. З урахуванням чутливості деяких способів виявлення нуклеїнових кислот, які використовують олігонуклеотиди, передбачається, що олігонуклеотиди, отримані з послідовностей, зазначених в SEQ ID NO: 3 можуть бути використані для виявлення відповідного сконструйовану інсектицидного білка в матеріалах, отриманих з об'єднаних джерел, де тільки частина матеріалу, отримана з трансгенної рослини, що містить SEQ ID NO: 3.

[0100] Інші відмітні ознаки і переваги цього винаходу будуть очевидні з наступних прикладів і формули винаходу.

ПРИКЛАДИ

[0101] Зважаючи на вищезазначене фахівцям в цій галузі техніки повинне бути зрозуміло, що можуть бути зроблені зміни в конкретних аспектах, які розкриті та буде отримано подібний або аналогічний результат, не відходячи від суті та об'єму винаходу. Таким чином, конкретні структурні та функціональні деталі, розкриті в цьому документі, не слід інтерпретувати як обмеження. Слід розуміти, що повне розкриття кожної із зазначених вище публікацій включено в опис цієї заявки.

ПРИКЛАД 1

Розробка модифікованих тестових білків і підготовка зразків для біологічного аналізу на комах

[0102] Цей Приклад ілюструє способи, прийняті для визначення відповідних амінокислотних залишків в каркасних білках, для модифікації, для створення модифікованих тестових білків, а також клонування та експресію отриманих модифікованих тестових білків.

[0103] Деякі методики молекулярної інженерії були використані в багаторівневому підході для конструювання покращених варіантів Cry1Da1, що мають покращений спектр інгібуючої активності по відношенню до лускокрилих і/або поліпшену інгібуючу активність по відношенню до лускокрилих в порівнянні з каркасними білками Cry1Da1 і TIC844 (гомолог Cry1Da1). Перший тур, або початковий етап конструювання, в першу чергу заснований на гіпотезах. Другі та треті тури були статистично керованими етапами конструювання. Наприклад, у другому турі конструювання, статистично нешкідливі мутації були комбіновані з передбачуваними корисними мутаціями для отримання подвійних мутацій, які відповідали певним статистичним критеріям. У третьому турі конструювання, всі дані з попередніх випробувань були проаналізовані за допомогою декількох статистичних методів. Тільки мутації, які продемонстрували статистично значуще поліпшення в більш ніж одному статистичному методі були обрані для остаточного пулу мутацій. Варіанти, розроблені в цьому турі, містили одну або дві позитивні мутації з варіантів, раніше підтверджених як позитивні. Таким чином, конструювання третього туру істотно збагачувало активні варіанти в порівнянні з першим і другим туром. Як показано в наступних прикладах, використання трьохтурової стратегії конструювання визначає як поодинокі, так і синергічні мутації, які забезпечили значне поліпшення активності проти CEW для деяких поліпшених варіантів по відношенню до каркасних TIC844 і Cry1Da1.

[0104] Способи, які були використані для створення модифікованих тестових білків включають, але не обмежені ними, напіввипадкові модифікації, спрямовані модифікації відхилень у вирівнюванні TIC844/Cry1Da1 з іншими нативними білками *Bacillus turingensis* (Bt), і структурно/функціональне конструювання. Приклади використовуваних методик молекулярної інженерії включають такі.

[0105] Зв'язування рецептора. Сприйнятливість лускокрилих комах-шкідників, зокрема, совки кукурудзяної (CEW, *Helicoverpa zea*) до поліпшених варіантів Cry1Da1/TIC844 може бути віднесена до різних цільових кишкових рецепторів. Підходи, які були використані для поліпшення зв'язування з рецепторами в кишечнику, тим самим збільшуючи токсичність, включають: (1) піддавання мутації кожної позиції в апікальних петлях домену II за всіма амінокислотними типами; і (2) заміну всіх можливих комбінацій апікальних петель домену II на ті

ж від інших гомологів Cry1Da1 (наприклад, Cry1Db1, Cry1Dc1) і CEW-активних трьохдомених токсинів (наприклад, Cry1Bb1, Cry1Ja1 і Cry2Ab2).

[0106] Підходи, засновані на вирівнюванні Вирівнювання Cry1Da1 з іншими гомологами (наприклад, Cry1Db1 і Cry1Dc1) було використано для ідентифікації областей мінливості. В результаті вирівнювання були ідентифіковані сто п'ятдесят (150) позицій і двісті дев'яносто п'ять (295) унікальних одиничних мутацій. Ці позиції були розташовані у всіх трьох доменах. Позиції в межах чотирьох (4) амінокислот один від одного, були згруповані разом. Тільки мутації з однакових вихідних послідовностей були призначені для кожної групи позицій, з утворенням сто тридцяти двох (132) унікальних варіантів.

[0107] Підходи поверхневого мутагенезу. Полінуклеотиди, що кодують поверхневі позиції в доменах II і III каркасних білків були піддані мутагенезу при скануванні. У позиціях каркасного білка, де не був присутній аланін, амінокислотні залишки були замінені на аланін. Аргінінові мутації в доповненні до аланінової були введені в поверхневих положеннях, в яких нативні залишки представляли собою лізин. Раціональність мутаційних замінів лізину на аргінін була заснована на спостереженні, що токсини, який має активність по відношенню до лускокрилих, як правило, мають дуже мало лізину та багато аргініну і, таким чином, була висунута гіпотеза про те, що зміна в поверхневих положеннях лізину в доменах II і III на аргінін може збільшити активність модифікованого тестового білка відносно лускокрилих.

[0108] Зміна протеолітичних подій. Існує гіпотеза, що протеолітичний процес є важливим аспектом діяльності трьохдомених токсинів в середній кишці лускокрилих комах. Для тестування цього було створено кілька наборів мутацій здатних змінювати будь-яке протеолітичне розщеплення. Потенційні сайти розщеплення розташовані на N-кінці та між доменом III і протоксином. Мутаційні позиції включають передбачені області петлі від N-кінця до початку спіралі 4, і з C-кінця домену III до ~40 амінокислот в протоксині. Як правило, залишки гліцину гіпотетично сприяли протеолізу або за допомогою розпізнавання протеолітичного сайту, або за рахунок збільшення гнучкості білка, тим самим роблячи його більш сприйнятливим до протеолітичного розщеплення. Крім того, трипсин і хімотрипсин обидва являють собою протеази, які широко відомі в якості життєздатних протеаз в середній кишці лускокрилих. Залишки лізину забезпечують сайти впізнавання для трипсину, а залишки тирозину забезпечують сайти впізнавання для хімотрипсина. Таким чином, обрані мутаційні позиції в потенційних сайтах розщеплення піддавали гліциновим, лізиновим або тирозиновим мутаціям.

[0109] Потенційні гарячі точки мутацій від інших CEW-активних токсинів. Були проаналізовані дані активності та відсутності активності проти CEW для великого набору білків (включаючи химер, фрагменти і нативні послідовності). Інформація, отримана зі статистичного аналізу цих даних, була використана для виявлення потенційних специфічних мутацій або позицій для мутацій, які, ймовірно, збільшать CEW-активності кінцевих модифікованих тестових білків.

[0110] Модифіковані тестові білки, отримані в результаті молекулярних методик інженерії, описаних вище, були клоновані з використанням способів, відомих в цій області техніки, в рекомбінантний експресійний вектор плазміді Bt, після специфічного промотору експресії спороутворення і трансформовані в некрystalоутворюючу клітину-хазяїна Bt.

ПРИКЛАД 2

Тестування модифікованих тестових білків в кормових біотестах проти лускокрилих шкідників

[0111] Цей Приклад ілюструє тестування модифікованих тестових білків, створених шляхом експериментів конструювання, описаних в Прикладі 1.

[0112] Шляхом експериментів конструювання, описаних в Прикладі 1, були зроблені близько двох тисяч п'ятисот (2500) рекомбінантних штамів Bt, що експресують більше двох тисяч трьохсот (2300) різних модифікованих тестових білків. Ці модифіковані тестові білки експресувалися Bt і випробовувалися на токсичність по відношенню до різних видів ряду Lepidoptera. Експерименти годування були проведені на новонароджених личинках (<24 годин після вилуплення) різних видів лускокрилих, включаючи совку кукурудзяну (CEW, *Helicoverpa zea*) і кукурудзяну листову совку (FAW, *Spodoptera frugiperda*). Яйця комахи для CEW-тестування були отримані з двох різних лабораторних колоній: Benson Research, Карлайл штат Пенсільванія і Monsanto Company, Юніон-Сіті, штат Теннессі. Всі експресовані модифіковані тестові білки були протестовані проти CEW, і деякі з цих модифікованих тестових білків, що демонструють підвищену активність проти CEW в порівнянні з їх батьківськими каркасними білками, були протестовані проти FAW, в доповненні до виконання додаткового біотеста для підтвердження активності проти CEW.

[0113] Різні протоколи для біотестів і оцінки смертності та затримки росту комах відомі в цій

області техніки. Були використані варіації способів, таких, як ті, які описані в публікації патентної заявки РСТ № WO 2012/139004 і в патенті США № 7927598.

ПРИКЛАД 3

Модифіковані тестові білки, які проявляють поліпшену активність проти CEW

5 [0114] Цей Приклад ілюструє відкриття розширеного інгібуючого спектра відносно лускокрилих і/або поліпшеної або збільшеної інгібуючої активності відносно лускокрилих для деяких з модифікованих тестових білків у порівнянні з активністю каркасних білків TIC844 або Cry1Da1 в декількох етапах тестування.

10 [0115] Модифіковані тестові білки, створені за допомогою експериментів конструювання, описаних в Прикладі 1, і випробуваних в біотесті комах, як описано в Прикладі 2, були випробувані в повторюваних етапах, в яких порівнювали активність по відношенню до видів лускокрилих модифікованих тестових білків з їх відповідними батьківськими каркасними білками (тобто, TIC844 або Cry1Da1). На першому етапі триста сімдесят (370) різних модифікованих тестових білків продемонстрували підвищену токсичність по відношенню до CEW в порівнянні з TIC844 або Cry1Da1 в кормовому біотесті. У кожному з цих кормових біотестів, однакові 15 кількості білка (або модифікований тестовий білок або каркасний білок) були надані CEW в контрольованих умовах аналізу з одноразовою дозою. Активність модифікованих тестів білків і каркасних білків визначали шляхом вимірювання та порівняння спостережуваної смертності та затримки росту кожного з біотестів модифікованих тестових білків до смертності, що 20 спостерігається та затримки росту біотестів батьківських каркасних білків.

25 [0116] З трьохсот сімдесяти (370) модифікованих тестових білків, які продемонстрували підвищену токсичність по відношенню до CEW в порівнянні з каркасними білками в однодозних тестах, близько ста вісімдесяти (180) з них були додатково перевірені в FAW-біотестах, щоб визначити, підтримували або проявляли ці модифіковані тестові білки підвищену активність по відношенню до FAW в порівнянні з їх батьківськими каркасними білками. Від близько сорока (40) до п'ятдесяти (50) з цих модифікованих тестових білків проявляли подібну або більш високу активність по відношенню до FAW в порівнянні з їх батьківськими каркасними білками. Ці 30 додатково досліджені модифіковані тестові білки були також випробувані в додаткових CEW-біотестах, для підтвердження активності по відношенню до CEW. В результаті цих етапів відбору і тестування модифікованих тестових білків, які продемонстрували поліпшену активність по відношенню до CEW при збереженні або поліпшенні активності по відношенню до FAW був отриманий остаточний список поліпшених варіантів (наведений в цьому документі як «сконструйовані інсектицидні білки»). У Таблиці 2 наводяться ці сконструйовані інсектицидні білки та амінокислотні мутації в кожному сконструйованому інсектицидному білку. У Таблиці 2 35 також представлена активність каркасних і сконструйованих інсектицидних білків по відношенню до CEW і FAW (інсектицидна активність показана в значенні LC50 (концентрація токсину, необхідна, для знищення 50 % популяції комах протягом заданої тривалості впливу. Чим нижче значення LC50, тим вище токсичність) і значенні MIC50 (концентрація, необхідна для пригнічення ліньки певної вікової стадії 50 % личинок протягом фіксованого тривалості впливу). В цій таблиці показано, що сконструйовані інсектицидні білки мають поліпшену активністю по відношенню до CEW, при збереженні або поліпшенні активності по відношенню до FAW. 40

Білок (Назва/SEQ ID NO.)	Амінокислотні Мутації*	LC ₅₀ (мкг/см ²) по відношенню до CEW колонії Benzop в підготовчому спорово- кристалічному біотесті	MIC ₅₀ (мкг/см ²) по відношенню до CEW Колонія Benzop в підготовчому спорово- кристалічному біотесті
Cry1Da1/NO: 2, 28	Відсутні (каркасний білок)	н/д **	~ 3,0
Cry1Da1_3/N O: 4	Cry1Da1 + Y316S	н/д **	н/д **
Cry1Da1_4/ NO: 6	Cry1Da1 + S374R	н/д **	н/д **
Cry1Da1_5/ NO: 8	Cry1Da1 + Y316S_I368R	н/д **	н/д **
Cry1Da1_6/ NO: 10	Cry1Da1 + S282K_Y316S_I368P	н/д **	н/д **

Cry1Da1_7/ NO: 12	Cry1Da1 + S282V_Y316S_I368P	н/д **	н/д **
TIC844/NO: 14	Відсутні (каркасний білок)	41,90	3,73
TIC844_2/NO: 16	TIC844 + Y316S_N375H_I432L	0,81	0,65
TIC844_4/NO: 18	TIC844 + Y316S	0,98	0,57
TIC844_5/NO: 20	TIC844 + S282K_Y316S_I368P	0,32	0,33
TIC844_6/NO: 22	TIC844 + S374R	4,09	1,39
TIC844_7/NO: 24	TIC844 + Y316S_I368R	0,93	0,61
TIC844_8/NO: 26	TIC844 + S282V_Y316S_I368P	0,221	0,064

* Амінокислотні мутації ідентифіковані з використанням стандартного коду IUPAC амінокислот. Див., IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984). Перша аббревіатура амінокислотної послідовності вказує на вихідну амінокислоту в цьому каркасному білку, число вказує положення амінокислоти, а друга аббревіатура амінокислотної послідовності, вказує на амінокислоту, розташовану в цьому положенні в удосконаленому варіанті білка.

** Основний токсин Cry1Da1 ідентичний основному токсину TIC844.

[0117] Далі демонструється покращений інгібуючий спектр лускокрилих і поліпшена інгібуюча активність по відношенню до лускокрилих для сконструйованих інсектицидних білків, летальність сконструйованого інсектицидного білка TIC844_8 по відношенню до його батьківського каркасного білка представлена на Фіг. 1. На гістограмі на Фіг.1 показано значення MIC50 TIC844_8 у порівнянні з каркасом білка TIC844 для двох різних колоній CEW, Union City та Benzon. Результати біотестів, зображені на Фіг. 1, були розраховані з біотестів препаратів, очищених градієнтом сахарози. Ці вторинні біотести були проведені з препаратами білків, очищеними градієнтом сахарози замість спорово-кристалічних препаратів білків для того, щоб гарантувати, що поліпшена активність TIC844_8 зберігається при більш інтенсивному очищенні. Крім того, колонію Union City тестували для підтвердження підвищеної активності, що спостерігається в колонії Benzon. Як показано на Фіг. 1, мутації в трьох залишках TIC844_8 (S282V_Y316S_I368P), надавали 8-кратне поліпшення летальності CEW, у порівнянні з TIC844, для колонії Union City та 50-кратне поліпшення летальності CEW, у порівнянні з TIC844, для колонії Benzon.

[0118] Далі демонструється покращений інгібуючий спектр по відношенню до лускокрилих і поліпшена інгібуюча активність по відношенню до лускокрилих для сконструйованих інсектицидних білків, профілі активності проти комах для TIC844 і TIC844_8 з кормових біотестів, що проводяться по відношенню до широкого спектра видів комах-лускокрилих, наведені в Таблиці 3. Комахи, по відношенню до яких проводилися випробування в біотестах з Таблиці 3, включають совку іпсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совку кукурудзяну (CEW, *Helicoverpa zea*), совку кукурудзяну листову (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совку південну (SAW, *Spodoptera eridania*), совку ні (CLW, *Trichoplusia ni*), вогнівку кукурудзяну (ECB, *Ostrinia nubilalis*), південно-західного кукурудзяного метелика (SWC, *Diatraea grandiosella*), совку тютюнову (TBW, *Heliothis virescens*), гусеницю оксамитових бобів (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), совку соєву (SBL, *Chrysodeixis includens*) і вогнівку цукрової тростини (SCB, *Diatraea saccharalis*). В цій Таблиці 3 представлений покращений інгібуючий спектр TIC844_8 по відношенню до лускокрилих в порівнянні з батьківським каркасним білком TIC844, зокрема, з поліпшеною активністю проти CEW і VBC.

Таблиця 3

Спектр активності для TIC844 і TIC844_8 по відношенню до комах.

SEQ ID NO.	Білок	BCW	CEW	FAW	SAW	CLW	ECB	SWC	TBW	VBC	SBL	SCB
26	TIC844_8		*	*	*	*				*	*	*
14	TIC844			*	*	*					*	*

* Активний відносно зазначених видів комах.

5 [0119] Покращений інгібуючий спектр сконструйованих інсектицидних білків по відношенню до лускокрилих, далі продемонстрований в Таблиці 4, в якій представлений профіль активності комах для деяких модифікованих інсектицидних білків з досліджень кормових біотестів. Комахи, по відношенню до яких проводилися випробування в біотестах з Таблиці 4, включають совку американську (CBW, *Helicoverpa armigera*), совку азіатську бавовняну (TCW, *Spodoptera litura*), совку малу (BAW, *Spodoptera exigua*), рожевого коробкового хробака (PBW, *Pectinophora gossypiella*), совку рожеву стеблову (PSB, *Sesamia inferens*) і совком плямисту (SBW, *Earias vitella*). Результати, представлені в Таблиці 4, вказують на підвищений інгібуючий спектр відносно лускокрилих у перерахованих сконструйованих інсектицидних білків (в порівнянні з каркасним білком Cry1Da1) зокрема, з поліпшеною активністю проти CBW, PBW (стійкі до Cry1Ac), PBW (природного походження) і SBW.

15

Таблиця 4

Порівняння профілів інсектицидної активності для Cry1Da1 і сконструйованих інсектицидних білків.

SEQ ID NO.	Білок	CBW	TCW	BAW	PBW (Вирощений в лабораторії)	PBW(стійкий до Cry1Ac)	PBW(природного походження)	PSB	SBW
2	Cry1Da1		+	+	+	+	+	+	
12	Cry1Da1_7	+	+	+	+	+	+		+
18	TIC844_4	+	+	+	+	+			+
20	TIC844_5	+	+	+	+	+			+
24	TIC844_7	+	+	+	+	+			

+ Активний відносно зазначених видів комах.

ПРИКЛАД 4

20 Синтез генів, що кодують інсектицидні сконструйовані білки і каркасні білки для експресії в рослинах

[0120] Цей приклад ілюструє синтез полінуклеотидів, що кодують сконструйовані інсектицидні білки і каркасні білки для експресії в рослинах.

25 [0121] Нуклеотидні послідовності, що кодують каркасні білки і сконструйовані інсектицидні білки для експресії в рослинах, були розроблені та синтезовані в відповідності зі способами, описаними в патенті США № 5500365, унікаючи певні невідповідні проблемні послідовності, такі як послідовності поліаденілювання рослин, збагачені АТТТА і А/Т, при збереженні амінокислотної послідовності вихідного каркасного або сконструйованого інсектицидного білка. Нуклеотидні послідовності цих генів, що кодують сконструйовані білки та каркасні білки для експресії в рослинах, наведені нижче в Таблиці 5.

30

Таблиця 5

Полінуклеотидні послідовності, сконструйовані для використання в рослинах, які кодують каркасні і сконструйовані інсектицидні білки.

Нуклеотидна SEQ ID NO.	БІЛОК	ВАРІАНТ
27	Cry1Da1.nno	Відсутні (каркасний білок)

29	Cry1Da1_2.nno	Cry1Da1 + A2 **
31	Cry1Da1_3.nno	Cry1Da1 + Y316S + A2
33	Cry1Da1_4.nno	Cry1Da1 + S374R + A2
35	Cry1Da1_5.nno	Cry1Da1 + S374R + A2
37	Cry1Da1_6.nno	Cry1Da1 + S282K_Y316S_I368P + A2
39	Cry1Da1_7.nno	Cry1Da1 + S282V_Y316S_I368P + A2
41	TIC844_9.nno	TIC844 + A2
43	TIC844_11.nno	TIC844 + S282V_Y316S_I368P + A2

** Позначення варіантів «A2» означає вставку залишку аланіну в амінокислотне положенні 2 в порівнянні з нативною послідовністю для цілей клонування в експресійні вектори рослин.

5 ПРИКЛАД 5

Експресійні касети для експресії модифікованих інсектицидних білків в рослинах

[0122] Цей приклад ілюструє конструювання експресійних касет, що містять полінуклеотидні послідовності, сконструйовані для використання в рослинах, які кодують каркасні і сконструйовані інсектицидні білки.

10 [0123] Різноманітні рослинні експресійні касети були сконструйовані з полінуклеотидної послідовністю, що кодує каркасні та сконструйовані інсектицидні білки, сконструйовані для експресії в рослинах, представлені в Таблиці 5. Такі експресійні касети можуть бути використані для тимчасової експресії в протопластах рослин або трансформації клітин рослин. Типові експресійні касети були сконструйовані з урахуванням можливого розміщення білка в клітині.

15 Один набір експресійних касет був розроблений таким чином, щоб забезпечити трансляцію білка і його розташування в цитоплазмі. Інший набір експресійних касет був розроблений для отримання транзитного пептиду, суміжного з білковим токсином, для забезпечення орієнтації на органели клітини, такі як хлоропласт або пластида. Усі експресійні касети були сконструйовані, щоб початися на 5'-кінці з промотора, який може складатися з декількох промоторних елементів, енхансерних елементів або інших експресійних елементів, відомих фахівцям в цій області техніки, функціонально зв'язаних, для підвищення експресії трансгена. За промоторною послідовністю, як правило безперервно слідує одна або більше лідерних послідовностей на 3'-кінці промотора. Інтронна послідовність, як правило, розташована на 3'-кінці лідерної послідовності, для поліпшення експресії трансгена. Послідовність, що кодує токсин або транзитний пептид, і послідовність, що кодує токсин, як правило, розташована на 3'-кінці функціонально зв'язаного промотора, лідера і інтрона. Послідовність 3'-НТО, як правило, розташована, на 3'-кінці кодуючої послідовності для полегшення термінації транскрипції та забезпечення послідовності, важливої для поліаденілювання одержуваного транскрипта. Всі елементи, описані вище, були функціонально зв'язані між собою і розташовані послідовно, часто з додатковими послідовностями, використовуваними для конструювання експресійної касети.

ПРИКЛАД 6

Трансформаційні вектори, що містять експресійну касету каркасного або сконструйованого інсектицидного білка

35 [0124] Цей приклад ілюструє включення каркасних або сконструйованих інсектицидних білків в тканини рослин.

[0125] Способи отримання трансгенної рослини, яка експресує сегмент нуклеїнової кислоти, що кодує каркасний білок або сконструйований інсектицидний білок може бути здійснені з використанням варіації способів, добре відомих в цій області техніки. Загалом, спосіб включає перетворення придатної клітини-хазяїна з сегментом ДНК, який містить промотор, функціонально зв'язаний з кодуючою ділянкою, яка кодує один або більше модифікованих інсектицидних білків або каркасних білків. Така кодуюча ділянка, як правило, функціонально зв'язана з ділянкою термінації транскрипції, причому промотор здатний управляти транскрипцією кодує ділянки в клітині, і, отже, забезпечує клітині здатність продукувати поліпептид *in vivo*. Вектори, плазміди, косміди і сегменти ДНК, які використовуються в трансформації таких клітин, як правило, включають оперони, гени або послідовності, отримані з генів, як нативні, так і отримані синтетично, зокрема ті, які кодують розкриті сконструйовані інсектицидні білки. Ці ДНК-конструкти можуть додатково містити структури, такі як промотори, енхансери, полілінкери, або інші генні послідовності, які можуть

регулювати діяльність конкретних бажаних генів. Отримані трансгенні рослини, частини рослин і клітини рослин тестували для визначення експресії та біологічної активності кодованого білка.

[0126] Приклади способів, які можуть бути модифіковані для отримання трансгенних рослин, які експресують білки, що проявляють активність по відношенню до лускокрилих, включають описані, наприклад, білки Cry1A (патент США № 5880275), Cry1B (публікація заявки на патент США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), химери Cry1A/F (патенти США № 7070982, 6962705 та 6713063) і білок Cry2Ab (патент США № 7064249).

ПРИКЛАД 7

Активність по відношенню до лускокрилих сконструйованого інсектицидного білка в стабільно трансформованій кукурудзі

[0127] Цей приклад ілюструє інгібіторну активність, що проявляється сконструйованими інсектицидними білками по відношенню до лускокрилих-шкідників, які експресовані рослинами кукурудзи і запропонованими у вигляді корму для відповідних комах-шкідників.

[0128] R0 трансгенні рослини кукурудзи, які експресують білки Cry1Da1 і Cry1Da1_7.nno були отримані з використанням векторів, що містять експресійні касети, описані в Прикладі 6. F1 трансгенні рослини кукурудзи були вирощені з насіння, отриманого шляхом запилення суцвіть з зародкової плазмою комерційних нетрансформованих рослин дикого типу пилком від R0 трансформантів.

[0129] Трансформовані клітини індукували для утворення рослин за допомогою способів, відомих в цій області техніки. Біотести з використанням дисків з листя рослин були проведені аналогічно тим, які описані в патенті США № 8344207. Нетрансформовану рослину використовували для отримання тканини для негативного контролю. Оцінювали безліч об'єктів трансформації для кожного бінарного вектора, і результати були зведені в таблицю.

[0130] Інсектицидна активність трансгенних рослин кукурудзи, що експресують білки Cry1Da1 і Cry1Da1_7.nno в поколіннях F1 і R0 приведена в Таблиці 6, в доповненні до інсектицидної активності трансгенних рослин кукурудзи, що експресують білки Cry1Da1 і Cry1Da1_7.nno на стадії F1 в польових умовах. Зокрема, в Таблиці 6 представлений профіль активності по відношенню до лускокрилих для Cry1Da1_7.nno в порівнянні з батьківським каркасним білком Cry1Da1 при тестуванні проти CEW, FAW і SWC. Як видно з Таблиці 6, на відміну від Cry1Da1, Cry1Da1_7.nno демонструє активність проти обох CEW і FAW в R0 і F1 біотестах і F1 польових випробуваннях.

Таблиця 6

Профіль інсектицидної активності для Cry1Da1 і Cry1Da1_7.nno, експресованих в рослинах кукурудзи.

Білок (SEQ ID NO.)	CEW			FAW			SWC		
	R0	F1	Пол _e	R0	F1	Пол _e	R0	F1	Пол _e
Cry1Da1 (28)	-	HT	HT	+	HT	HT	-	HT	HT
Cry1Da1_7.nno (40)	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+ Активний по відношенню до видів комах; - Неактивний по відношенню до видів комах; HT не тестували

ПРИКЛАД 8

Активність по відношенню до лускокрилих у модифікованих інсектицидних білків в стабільно трансформованому бавовнику

[0131] Цей приклад ілюструє інгібіторну активність, що проявляється сконструйованими інсектицидними білками по відношенню до лускокрилих-шкідників, які експресовані рослинами бавовника і запропонованими у вигляді корму для відповідних комах-шкідників.

[0132] Рослини бавовнику, які експресують білки Cry1Da1_7.nno і TIC844_11.nno були отримані з використанням векторів, що містять експресійні касети, описані в Прикладі 6. Трансформовані клітини індукували для утворення рослин за допомогою способів, відомих в цій області техніки. Тканина листя бавовнику використовували в біотесті, описаному в Прикладі 7, і випробовували проти CBW, FAW, совки тютюнової (TBW, *Heliothis virescens*) і SBL. В Таблиці 7 представлена активність, яка спостерігається по відношенню до цих видів лускокрилих в

стабільно трансформованому поколінні R0 бавовнику. Як видно з Таблиці 7, Cry1Da1_7.nno і TIC844_11.nno продемонстрували активність по відношенню до двох або більше видів лускокрилих-шкідників в стабільно трансформованому поколінні R0 бавовнику.

Таблиця 7

Біотест профілю активності Cry1Da1_7.nno і TIC844_11.nno експресованих в поколінні R₀ бавовнику.

Токсин	CBW	FAW	TBW	SBL
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	+
TIC844_11.nno (SEQ ID NO: 44)	+	+	-	+

5

+ Активний по відношенню до видів комах; - Неактивний по відношенню до видів комах.

[0133] Вибрані об'єкти трансформації були використані для отримання R1 рослин. R1 рослини, які експресують Cry1Da1_7.nno, аналізували на стійкість до CBW, FAW і SBL. Тканини листа, бутону та коробочки використовували в біотестах, в доповненні до польових випробувань, проведених в теплицях. В Таблиці 8 продемонстрована активність, що спостерігається в цих тестах. Як показано в Таблиці 8, Cry1Da1_7.nno продемонстрував активність проти CBW, FAW і SBL в біотестах і польових випробуваннях.

10

Таблиця 8

Профіль інсектицидної активності Cry1Da1_7.nno, експресованого в поколінні R₁ бавовнику.

Токсин	CBW			FAW			SBL	Теплиця	
	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	Бутон	Коробочка	Лист	CBW	FAW
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

15

+ Активний відносно видів комах; - Не активний по відношенню до видів комах.

ПРИКЛАД 9

Активність по відношенню до лускокрилих у модифікованих інсектицидних білків в стабільно трансформованій сої

20

[0134] Цей приклад ілюструє інгібіторну активність, що проявляється сконструйованими інсектицидними білками по відношенню до лускокрилих-шкідників, які експресовані рослинами сої і запропонованими у вигляді корму для відповідних комах-шкідників.

[0135] Рослини сої, які експресують білки Cry1Da1_7.nno, TIC844_9.nno і TIC844_11.nno були отримані з використанням векторів, що містять експресійні касети, описані в Прикладі 6. Тканину листа збирали і використовували в біотесті, як описано в Прикладі 7, або, в альтернативному варіанті, ліофілізовану тканину використовували в раціоні комах для біотестів. Біотест проводили по відношенню до різних видів лускокрилих, в тому числі SAW, SBL і совки кукурудзяної (SPW, *Helicoverpa zea*). В Таблиці 9 представлена активність, яка спостерігається по відношенню до цих лускокрилих-шкідників в стабільно трансформованому поколінні R0 сої. Як видно з Таблиці 9, Cry1Da1_7.nno і TIC844_11.nno продемонстрували активність по відношенню до SPW, SAW і SBL. TIC844_9.nno (TIC844 плюс додатковий аланін для клонування) не продемонстрували активність проти SPW.

30

Таблиця 9

Біотест профілю активності Cry1Da1_7.nno, TIC844_9.nno і TIC844_11.nno експресованих в поколінні R₀ сої.

Токсин	SPW	SAW	SBL
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+
TIC844_11.nno (SEQ ID NO: 44)	+	+	+
TIC844_9.nno (SEQ ID NO: 42)	-	+	+

+ Активний по відношенню до видів комах; - Неактивний по відношенню до видів комах.

- 5 [0136] Вибрані об'єкти трансформації були використані для отримання R1 рослин. R1 рослини, які експресують Cry1Da1_7.nno, аналізували на стійкість до SAW, SBL, SPW і гусениці оксамитових бобів (VBC, *Anticarsia gemmatalis*). Тканина листа збирали з рослин покоління R1 і використовували в кормовому біотесті. В Таблиці 10 продемонстрована активність, що спостерігається в цих тестах. Як показано в Таблиці 10, Cry1Da1_7.nno продемонстрував активність по відношенню до SPW, SAW і SBL.

Таблиця 10.

Біотест профілю активності Cry1Da1_7.nno, експресованого в поколінні R₁ сої.

Токсин	SPW	SAW	SBL	VBC
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	+	+	-

+ Активний по відношенню до видів комах; - Неактивний по відношенню до видів комах.

- 15 [0137] У Таблиці 11 представлено результати польових випробувань, проведених в теплицях на стабільно трансформованих рослинах сої покоління R1, що експресують Cry1Da1_7.nno. Види, використані для зараження рослин в теплицях, включають совку чорну (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), моль квасоляну (BSM, *Crociosema aporema*), совку американську (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), п'ядуна соняшникового (SFL, *Rachiplusia nu*) і VBC. В Таблиці 11 продемонстрована активність, що спостерігається в цих тестах. Як показано в Таблиці 11, Cry1Da1_7.nno продемонстрував активність по відношенню до BLAW, SAPW і SFL.

Таблиця 11.

Профіль активності Cry1Da1_7.nno, експресованого в поколінні R₁ сої протестований в польових випробуваннях в теплиці.

Токсин	BLAW	BSM	SAPW	SFL	VBC
Cry1Da1_7.nno (SEQ ID NO: 40)	+	-	+	+	-

- 25 + Активний по відношенню до видів комах; - Неактивний по відношенню до видів комах.

- 30 [0138] Всі композиції і способи, описані і заявлені в цьому документі, можуть бути проведені та здійснені без зайвих експериментів в межах цього опису. Хоча композиції винаходу були описані з точки зору вищезазначених ілюстративних варіантів реалізації, фахівцям в цій області техніки буде зрозуміло, що варіанти, зміни, модифікації та перебудови можуть бути застосовані до композиції, описаної в цьому документі, без відступу від концепції, сутності та обсягу цього

винаходи. Більш конкретно, буде очевидно, що певні агенти, які схожі і хімічно, і фізіологічно, можуть бути використані замість агентів, описаних в цьому документі, досягаючи тих самих або подібних результатів. Всі такі аналогічні заміни та модифікації, очевидні фахівцям в цій області техніки, вважаються такими, що виходять за межі суті, об'єму і концепції цього винаходу, як визначено в наведеній формулі винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сконструйований інсектицидний білок, який містить SEQ ID NO: 44, який **відрізняється** тим, що сконструйований інсектицидний білок виявляє інгібувальну активність проти видів комах ряду *Lepidoptera*.
2. Сконструйований інсектицидний білок за п. 1, який **відрізняється** тим, що види ряду *Lepidoptera* вибрані з групи, яка складається з родів *Spodoptera* і *Helicoverpa*.
3. Сконструйований інсектицидний білок за п. 1, який **відрізняється** тим, що види ряду *Lepidoptera* вибрані з групи, яка складається з видів *Helicoverpa zea* і *Spodoptera frugiperda*.
4. Полінуклеотид, який кодує сконструйований інсектицидний білок, причому полінуклеотид функціонально зв'язаний з гетерологічним промотором, а сконструйований інсектицидний білок містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 44.
5. Полінуклеотид, який кодує сконструйований інсектицидний білок, який **відрізняється** тим, що вказаний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка:
 - а) представлена SEQ ID NO: 43; або
 - б) кодує сконструйований інсектицидний білок, що містить SEQ ID NO: 44.
6. Клітина-хазяїн, яка містить полінуклеотид, представлений SEQ ID NO: 43, де вказана клітина-хазяїн вибрана з групи, яка складається з бактеріальної клітини-хазяїна і рослинної клітини-хазяїна.
7. Клітина-хазяїн за п. 6, де вказана бактеріальна клітина-хазяїн вибрана з групи, яка складається з *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* і *Erwinia*.
8. Клітина-хазяїн за п. 6, де вказана рослинна клітина-хазяїн вибрана з групи, яка складається з однодольних і дводольних рослин.
9. Композиція, яка має інгібувальну активність відносно комах, яка містить сконструйований інсектицидний білок, що містить SEQ ID NO: 44.
10. Композиція, яка має інгібувальну активність відносно комах за п. 9, яка додатково містить щонайменше один агент, який має інгібувальну активність відносно комах, який відрізняється від сконструйованого інсектицидного білка.
11. Композиція, яка має інгібувальну активність відносно комах за п. 10, де вказаний щонайменше один агент, який має інгібувальну активність відносно комах, вибраний з групи, яка складається з білка, який має інгібувальну активність відносно комах, і молекули дЛРНК, яка має інгібувальну активність відносно комах.
12. Композиція, яка має інгібувальну активність відносно комах за п. 10, де вказаний щонайменше один інший агент, який має інгібувальну активність відносно комах, виявляє активність відносно одного або більше видів шкідників рядів *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Homoptera* або *Thysanoptera*.
13. Трансгенне насіння, яке містить:
 - а) інгібуючу ефективну відносно комах кількість сконструйованого інсектицидного білка, що містить SEQ ID NO: 44; або
 - б) полінуклеотид, представлений SEQ ID NO: 43.
14. Спосіб боротьби з лускокрилим шкідником, що включає подачу в раціон лускокрилому шкіднику інгібуючої кількості сконструйованого інсектицидного білка за п. 1.
15. Трансгенна клітина рослини, рослина або частина рослини, що містять сконструйований інсектицидний білок за п. 1.
16. Спосіб боротьби з лускокрилим шкідником, що включає подачу в раціон шкіднику трансгенної клітини рослини, рослини або частини рослини за п. 15, причому клітина рослини, рослина або частина рослини експресують інгібуючу відносно лускокрилих кількість сконструйованого інсектицидного білка.
17. Товарний продукт, отриманий з трансгенної клітини рослини, рослини або частин рослини за п. 15, де вказаний продукт містить сконструйований інсектицидний білок, і де вказаний продукт вибраний з групи, яка складається з біомаси рослини, борошна грубого помелу, корму для тварин, борошна, пластівців, висівок, волокна, лушпиння і обробленого насіння.

18. Спосіб отримання насіння, що містить сконструйований інсектицидний білок за п. 1, який включає:

- a) посадку множини насінин, які містять сконструйований інсектицидний білок за п. 1;
- b) вирощування рослин з вказаного насіння; і
- 5 c) збір насіння від вказаних рослин, де вказане зібране насіння містить сконструйований інсектицидний білок за п. 1.

10 19. Рекombінантна полінуклеотидна молекула, яка кодує сконструйований інсектицидний білок за п. 1, яка містить нуклеотидну послідовність, яка містить SEQ ID NO: 43; і полінуклеотидну послідовність, яка кодує агент, який має інгібіторну активність відносно комах, який відрізняється від інсектицидного білка.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601