

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 103831 A



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

6(51) C 12 N 15/82

C 07 K 16/44

C 12 N 15/13

A 01 H 5/00

A 01 N 63/00

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 103831

(22) Заявено на 22.10.99

(24) Начало на действие  
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 19712507 (32) 25.03.97 (33) DE

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 7 на 31.07.2000

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №  
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

BASF AKTIENGESELLSCHAFT  
LUDWIGSHAFEN (DE)

(72) Изобретател(и):

Jens Lerchi, Ladenburg  
Achim Moeller, Gruenstadt  
Ralf-Michael Schmidt, Kirrweiler  
Helmut Schiffer, Mutterstadt  
Udo Rabe, Dannstadt-Schau  
Udo Conrad, Gatersleben (DE)

(74) Представител по индустриална  
собственост:

Правда Георгиева Бойкова,  
1000 София, ул. "Хан Аспарух" 26

(86) № и дата на РСТ заявка:  
PCT/EP98/01731, 24.03.98

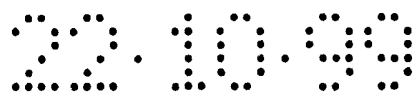
(87) № и дата на РСТ публикация:  
WO98/42852, 01.10.98

(54) ЕКСПРЕСИЯ НА ХЕРБИЦИДСВЪРЗВАЩИ ПОЛИПЕПТИДИ В РАСТЕНИЯ ЗА СЪЗДАВАНЕ НА ПОНОСИМОСТ СПРЯМО ХЕРБИЦИДИ

(57) Методът за създаване на поносимост в растения спрямо хербициди се осъществява чрез експресия на хербицидсвързващо антительо в растенията.

27 претенции

BG 103831 A



900.99-ПБ

## ЕКСПРЕСИЯ НА ХЕРБИЦИД-СВЪРЗВАЩИ ПОЛИПЕПТИДИ В РАСТЕНИЯ ЗА СЪЗДАВАНЕ НА ПОНОСИМОСТ СПРЯМО ХЕРБИЦИДИ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до метод за получаване на растения с поносимост спрямо хербициди, чрез експресия на екзогенен хербицид-свързващ полипептид в растения или в части от растения. Изобретението се отнася освен това до използване на съответни нуклеинови киселини, кодиращи полипептид, анти-тяло или части на антитяло с хербицид-свързващи свойства в трансгенни растения и по този начин до трансформираното растение само по себе си.

Предшествуващо състояние на техниката

Известно е, че с помощта на методите на генното инженерство, могат целенасочено в генома на растението да се въведат чужди гени. Този процес се нарича трансформация и получените растения се наричат трансгенни. Трансгенни растения се използват понастоящем в различни биотехнологични области. Така напр. са описани растения, резистентни спрямо инсекти (Vaek et al. Plant Cell 5 (1987), 159-169), растения, резистентни спрямо вируси (Powell et al. Science 232 (1986), 738-743) и растения, резистентни спрямо озон (Van Camp et al. BioTech. 12 (1994), 165-168). Примери за подобряване на качеството по пътя на генното инженерство са: повишаване на съхраняемостта на

плодове (Oeller et al. Science 254 (1991), 437-439); повишаване на продукцията на нишесте в картофени растения (Stark et al., Science 242 (1992), 419), промяна на нишестения състав (Visser et al. Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296), промяна на липидния състав (Voelker et al. Science 257 (1992), 72-74) и продукцията на непривични за растението полимери (Poirer et al. Science 256 (1992), 520-523).

Важна цел на работата в областта на молекулната генетика на растенията е да се създаде поносимост спрямо хербициди. Тя се изразява с повишена по вид или по сила поносимост на растенията или на части от тях спрямо приложен хербицид. Тази поносимост може да се повлияе по различен начин. Познатите методи се състоят в използване на ген на метаболизъм, напр. *pat-1*, в зависимост от глуфозинатна резистентност (WO 8705629) или на хербицид-резистентен целеви ензим, както е напр. в случая с *Enolpyruvylshiki-mat-3-phosphat-Synthase* (WO 9204449), който е резистентен спрямо глифосфат, както и използване на хербицид в клетъчни и тъканни култури за селекция на растителни клетки с добра поносимост и на получените резистентни растения, както е описано за ацетил CoA карбоксилазни инхибитори (US 5162602, US 5290696).

Антителата са протеини, които са част от имунната система. Всички антитела имат пространствена глобуларна структура, изградена от по-леки и по-тежки вериги. Те по принцип имат способността да могат да свързват молекули или части от структурата на молекули с голяма специфичност (Alberts et al.,: *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Auflage 1990, VCN Verlag, ISBN 3-527-27983-0, 1198-1237). Въз основа на тези свойства антителата се използват за различни цели. При това се различава използване

на антитела в животински или човешки организми, които ги продуцират, тъй наречените *in-situ* използване, както и *ex-situ* използване, т.е. използването на антитела след изолиране от продуциращите клетки или организми (Whitelam und Cockburn, TIPS Vol. 1, 8 (1996), 268-272).

Използването на хибридни соматични клетъчни линии (хибридоми) като източник на антитела спрямо конкретно определени антигени е познато от работите на Koehler и Milstein (Nature 256 (1975) 495-97) и след това. По този метод се получават тъй наречените моноклонални антитела, които притежават единна структура и са получени чрез клетъчно сливане. За целта клетки от далака на имунизирана мишка се сливат с клетки на миши-миелом. Така се получават хибридомни клетки, които се размножават неограничено. Същевременно клетките отделят специфични антитела срещу антигени, с които мишката е била имунизирана. Клетките от далака създават възможност за продукция на антитела, докато миеломните клетки осигуряват неограничена възможност за растеж и направляват непрекъснатата секреция на антитела. Тъй като всяка хибридомна клетка се отделя като клон от една единствена В-клетка, то всички изградени молекули на антитела притежават еднаква структура, включително на антиген-свързващото място. Този метод дава тласък на използването на антитела, тъй като чрез него са на разположение неограничен брой антитела с еднаква, позната специфичност и с хомогенна структура. Моноклонални антитела намират вече приложение при имунодиагностиката и като терапевтични средства.

От няколко години съществува тъй нареченият Phagen-Display-метод за получаване на антитела, при който се избягва въздействие върху имунната система и някои имунизирания на

животни. При това афинитетът и специфичността на антителата *in vitro* се изравняват (Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994), 433-455; Hoogenboom *TIBTech Vol 15* (1997), 62-70). Генните сегменти, които съдържат кодиращата секвенция на променлив регион от антитела, т.е. антиген-свързващите места, се сливат с гени за обвиващ протеин на бактериофаг. След това бактериите се инфектират с фаги, които съдържат такива слети гени.

Получаващите се части от фаги притежават сега обвивки от антитяло-подобни слети протеини, при което свързващите антителата домени се показват навън. От такава Phagen-Display-библиотека могат да се изолират фаги, които съдържат желаните фрагменти от антитела и са свързани специфично към определен антиген. Всяка изолирана по този начин фага произвежда моноклонален, антигенсвързващ полипептид, който отговаря на едно моноклонално антитяло. Гените на антигенсвързващото място, които са различни за всяка фага, могат да се изолират от фага-ДНК и да се вложат в конструкция на пълноценни антитялогени.

В областта на растителната защита, антителата се използват особено като средство за анализ *ex-situ* за количесвено и качествено доказване на антигени. Това включва доказване на съдържанието на вещества в растенията, на хербициди или фунгициди в питейната вода (Sharp et al. (1991) *ACS Symp Ser.*, 446 (*Pestic. Residues Food Saf.*) 87-95), в проби от пръст (WO 9423018) или в растения или части от растения. Освен това антителата се използват като помощно средство за почистване от свързани молекули.

Производството на имуноглобулини в растения за пръв път е описана от Hiatt et al., *Nature*, 342 (1989), 76-78. Спектърът се

простира от едноверижни антитела, до многоверижни секреторни антитела (J. Ma und Mich Hein, 1996, *Annuals New York Academy of Sciences*, 72- 81).

При по-нови опити, антитела се използват *in-situ* за защита от патогени в растения, по-специално от вирусни заболявания, чрез експресия на специфични антитела или части от тях, насочена срещу вирусни обвивни протеини в растителни клетки (Tavladoraki et al., *Nature* 366 (1993), 469-472; Voss et al., *Mol. Breeding* 1 (1995), 39-50).

Подобно приложение е използването за защита от инфекция на растенията чрез нематоди (Rosso et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 220 (1996), 255-263). Известни са също примери за фармацевтично приложение на експресията на антитела *in-situ* в растения за нуждите на орално имунизирание, напр. (Ma et al., *Science* 268 (1995), 716-719; Mason und Arntzen, *Tibtech Vol. 13* (1996), 388-392). Изградените от растението антитела при това се приемат чрез растението или чрез консумиране на подходящи части от растението, като се усвояват чрез устата, фаринкса или стомашночревния тракт на тялото и причиняват активен имунитет. Освен това е известно експресирание на едноверижни антитела (*single chain antibody*) в растения срещу нискомолекуления растителния хормон абсцизинова киселина, при което се наблюдава понижено наличие на растителния хормон въз основа на свързването на абсцизиновата киселина в растението (Artsaenko et al., *The Plant Journal* (1995), 8. (5), 745-750).

Борбата с плевели по химически начин при важните за селското стопанство култури изисква използването на високо-селективни хербициди. В някои случаи все пак е трудно да се създадат хербициди с достатъчно висока селективност, които да

не причиняват вреди на културното растение. Създаването на резистентни към хербицида или понасящи хербицида културни растения може да допринесе за решаване на този проблем.

На разработването на резистентни към хербициди културни растения чрез тъканни култури или мутагенеза на семената и естествен подбор се поставят граници. Така чрез генното инженерство могат да се манипулират само тези растения, регенерирането на които става от клетъчната култура до цялото растение. Освен това културните растения могат да проявят след мутагенеза и селекция нежелани свойства, които биха могли да бъдат отстранени чрез частично многократно обратно кръстосване. Също би могло да бъде ограничено създаването на резистентност чрез кръстоска върху растения от същия вид.

От тези съображения от присадката, създадена по пътя на генното инженерство трябва да се изолира кодиращ резистентност ген и целенасочено да се прехвърли, при използване на класическите методи за отглеждане на растението.

Развитието на поносимост спрямо хербициди по пътя на молекулната биология, напр. създаването на културни растения резистентни спрямо хербициди, изискваше досега въздействащият механизъм на хербицида в растението да е познат и да бъде намерен ген, който да причинява резистентност спрямо хербицида. Много от търговски използваните понастоящем хербициди действат чрез блокиране на ензим, необходим за биосинтезата на основна аминокиселина, липид или пигмент. Чрез промяна на гена на този ензим се стига до това, че хербицидът не може повече да се свърже и чрез въвеждане на тези променени гени в културните растения се създава поносимост спрямо хербицида. Алтернативно, примерно в природата могат да се намерят аналогични

ензими, напр. в някои микроорганизми, които способстват за природна резистентност спрямо хербициди. Този способстващ за резистентност ген се изолира от такъв микроорганизъм, клонира се в подходящи вектори и накрая след успешна трансформация се въвежда за експресия в културно растение, което е чувствително спрямо хербицид (WO 96/38567).

Задача на настоящето изобретение е да се създаде нов вид общоприложим метод на генното инженерство за отглеждане на понасящи хербицида трансгенни растения.

Техническа същност на изобретението

Сега по неочакван начин е създаден метод за експресия на екзогенни полипептиди, антитела или части от антитела, които притежават свойството да свързват хербицида в растенията.

Един първи обект на изобретението представлява получаването на хербицид-свързващо антитяло и клониране на принадлежащия ген, съответно генен фрагмент.

Първоначално се продуцира антитяло, което да свързва хербицида. Това може да стане напр. чрез имунизирание на гръбначни животни, най-често мишка, плъх, куче, кон, магаре или коза с антиген. Антигенът при това е хербицидно активно вещество, което е присъединено или асоциирано чрез функционална група към високомолекулен носител, като говежди серумен албумин (BSA), кокоши белтък (овалбумин), keyhole limpet хемоцианин (KLH) или други носители. Иmunният отговор след многократно използване на антиген при допълнително провеждане по бързите методи води до изолиране на подходящ антисерум. Този продукт доставя първоначално поликлонален серум, който съдържа антитела с различна специфичност. За целите на използване *in situ* е необходимо да се изолира секвенция, кодираща за

определени специфични моноклонални тела. За постигане на тази цел има различни пътища. Първият от тях използва сливане на клетки, продуциращи антитела с ракови клетки до една постоянно продуцираща антитела хибридома-клетъчна култура, която чрез уеднаквяване на получените клони накрая води до получаване на хомогенна, дефинирана моноклонална, продуцираща антитела клетъчна линия.

От една такава моноклонална клетъчна линия се изолира кДНК за антитела, съответно части от антитела, на тъй-наречените едноверижни антитела (single chain antibody - scFv). Тези кДНК-секвенции могат след това да се клонират в експресионна касета и да се използват за функционална експресия в прокариотни и еукариотни организми, включително в растения.

Възможно е също по метода Phagen-Display-Banken да се селектират антитела, които да свързват молекулите на хербицида и да се получи каталитично продукт, който не притежава хербицидни свойства. Методи за получаване на каталитични антитела са описани от Janda et al., в Science 275 (1997) 945-948, Chemical selection for catalysis in combinatorial Antibody libraries; Catalytic Antibodies, 1991, Ciba Foundation Symposium 159, Wiley-Interscience Publication. Чрез клониране на гена на това каталитично антитяло и експресията му в растение може по принцип също така да се получи резистентно спрямо хербицид растение.

Обект на изобретението са по-специално експресионни касети, кодиращите секвенции на които кодират за хербицид-свързващ полипептид или за негови функционални еквиваленти, както и тяхното използване за получаване на устойчиви спрямо хербициди растения. Секвенцията от нуклеинови киселини може при това да бъде напр. една ДНК- или кДНК-секвенция. За



въвеждане в експресионната касета, съгласно изобретението, на подходящи кодиращи секвенции се предлагат напр. такива, които съдържат една ДНК-секвенция, получена от една хибридомна клетка, която кодира за полипептид с хербицид-свързващи свойства и която осигурява на гостоприемника резистентност спрямо инхибиторни растителни ензими.

Експресионната касета съгласно изобретението съдържа освен това регулативна секвенция от нуклеинови киселини, която направлява експресията на кодираща секвенция в клетките на гостоприемника. Съгласно една предпочитана форма на изпълнение на изобретението, експресионната касета обхваща по направление нагоре, т. е. на 5'-края на кодиращата секвенция един промотор и по направление надолу, т.е. на 3'-края на секвенцията един полиаденилиращ сигнал и в даден случай други регулационни елементи, които с намиращата се помежду кодираща секвенция са свързани оперативно с пептида с хербицид-свързващи свойства и/или с транспептид. Под понятието оперативно свързване се разбира последователното подреждане на промотор, кодираща секвенция, терминатор и в даден случай други регулиращи елементи, по такъв начин, че да може всеки от регулиращите елементи да изпълни своята функция при експресията на кодиращите секвенции по предназначение. Предпочитаните за оперативното свързване секвенции, без изобретението да се ограничава до тях, са целевите-секвенции за осигуряване на субцелуларна локализация в апопластите, в плазмените мембрани, във вакуолите, в пластидите, в митохондрията, в ендоплазматичния ретикулум (ER), в ядрото на клетката, в маслените телца и в други части и транслационните усилватели, като напр. 5'-

въвеждащата секвенция от Tabak Mosaic Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

Като промотор на експресионната касета съгласно изобретението е подходящ общо взето всеки промотор, който може да направлява експресията на фрагменти. Така напр. се използва по-специално растителен промотор, или промотор, който произхожда от растителен вирус. Особено предпочитан е CaMV-35S-промотор от цветно зеле-Mosaic Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Този промотор съдържа различни отличителни секвенции за транскрипционални ефектори, които в тяхната цялост водят до постоянна и конститутивна експресия на въведения ген (Benfey et al., EMBO J., 8 (1989), 2195-2202).

Експресионната касета съгласно изобретението може да съдържа също химически индуциращ се промотор, чрез който експресията на екзогенни полипептиди в растенията може да бъде направлявана до един определен момент във времето. Такива промотори, като напр. PRP1-промотор (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22(1993), 361-366), промотор, индуциращ се чрез салицилова киселина (WO 95/1919443), промотор, индуциращ се от бензен-сулфонамид (EP 388186), промотор, индуциращ се от абсцизинова киселина (EP 335528), съответно промотор, индуциращ се от етанол или циклохексанон (WO 9321334), са описани в литературата и могат също така да бъдат използвани.

Освен това са предпочитени особено промотори, които осигуряват експресия в тъкани или части от растения, в които се разпространява действието на хербицида. По-специално трябва да бъдат споменати промотори, които осигуряват специфична експресия в листата. Могат да се споменат промоторите на

цитозолна FB-фаза от картофи или ST-LSI промотор от картофи (Stockhaus et al., EMBO J., 8 (1989), 2445-245).

С помощта на промотор, специфичен за семена, могат да се експресират едноверижни-антитела, стабилни до 0.67 % спрямо общата стойност на разтворими семе-протеини в семената на трансгенни тютюневи растения (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Тъй като е възможна също експресия в засети или покълнали семена, то по смисъла на настоящето изобретение, специфични промотори от кълнове или семена могат да са също така предпочитани регулиращи елементи съгласно изобретението. Експресионната касета съгласно изобретението може да съдържа също напр. специфичен за семена промотор (за предпочитане USP- или LEB4-промотор, LEB4-сигнален пептид), който съдържа гена за експемирание и един ER-задържащ сигнал. Изграждането на касетата е показано схематично на фигура 1, като пример за едноверижно антитяло (scFv-Gen).

Получаването на експресионна касета съгласно изобретението се провежда чрез сливане на подходящ промотор с подходяща полипептид-ДНК и за предпочитане инсерция на един междинен промотор и полипептид-ДНК, за една хлоропласти-специфична, кодираща транзитен пептид ДНК, както и един полиаденилиращ сигнал, при използване на бързи рекомбинационни и клониращи техники, каквито са описани например от T. Maniatis, E.F. Fritsch и J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), също и от t. J. Silhavy, M.L. Berman und L. W. Enguist, в Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984), и от Ausubel, F.M. et al.,

Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Особено предпочитани са секвенции, които са насочени към апопласти, пластиди, вакуоли, плазмени мембрани, митохондрии, ендоплазматичен ретикулум (ER) или чрез отсъствие на съответна оперативна секвенция на мястото на създаване осигуряват оставането на цитозол (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). За количеството на натрупване на протеин в трансгенни растения се оказва особено необходима локализация в ER, както и в стената на клетката (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792; Artsaenko et al., Plant J., 8, (1995), 745-750).

Обект на изобретението са също експресионни касети, кодиращата секвенция на които кодира хербицид-свързващ слят протеин, при което част от слетия протеин е транзитен пептид, който направлява транслокация на полипептида. Особено предпочитани са хлоропласт-специфични транзитни пептиди, които след транслокация на хербицид свързващите полипептиди в растителните хлоропласти се отцепват ензимно от хербицид-свързващата полипептидна част. Особено се предпочита транзитният пептид да се отстрани от пластидната транскетолаза (ТК) или един функционален еквивалент на този транзитен пептид (напр. транзитен пептид на малките елементи на Rubisko или на Ferredoxin NADP- оксидоредуктаза).

Необходимите за получаване на експресионни касети съгласно изобретението полипептид-ДНК или кДНК се амплифицират за предпочитане с помощта на метода Polymerase Chain Reaction (PCR). Познати са методи за ДНК-амплификация чрез PCR, напр. описаните от Innes et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990). Целесъобразно

е получените по метода PCR ДНК-фрагменти да се подлагат на изпитване чрез секвенционен анализ за избягване на грешки на полимеразата в конструкта, подлежащ на експресия.

Включената нуклеотидна секвенция, кодираща за хербицид-свързващ полипептид може да се получи по синтетичен път или да е получена в природата, или да съдържа смес от синтетични и природни ДНК-съставни части. Общо взето синтетичните нуклеотидни секвенции се получават с кодони, които са предпочитани от растения. Тези предпочитани от растенията кодони могат да се определят от кодони с по-високо протеиново число, които се експресират най-често в интересни растителни видове. При получаване на експресионна касета могат да се обработят различни ДНК-фрагменти, за да се получи нуклеотидна секвенция, която целесъобразно е насочена в коректната посока и която е изградена с коректен Leseraster. За свързване на ДНК-фрагментите един с друг могат към фрагментите да се присъединят адаптери или свързваща ДНК.

По целесъобразен начин трябва областите на промотора и терминатора в посока на транскрипцията да бъдат снабдени с свързваща ДНК или с много свързващи ДНК, които съдържат едно или повече рестрикционни места за въвеждане на тази секвенция. По правило свързващата ДНК има 1 до 10, най-често 1 до 8, за предпочитане 2 до 6 рестрикционни места. Общо взето свързващата ДНК има в регулаторната област големина по-малка от 100 bp, често пъти по-малка от 60 bp и все пак най-малко 5 bp. Промоторът съгласно изобретението може да бъде както природен продукт, съответно хомоложен, така и чужд, съответно хетероложен за растението гостоприемник. Експресионната касета съгласно изобретението съдържа в 5'-3'-транскрипционно

направление промотора, съгласно изобретението, една произволна секвенция и една област на транскрипционното прекратяване. Различните области на прекратяване на синтеза са произволно взаимозаменяеми.

Освен това могат да се въведат манипулации, които осигуряват протичащите рестрикционни етапи или с които се отстранява излишната ДНК или се отстраняват рестрикционните места на късане. Където става въпрос за инсерция, делеция или заместване, като напр. транзиция и трансверсия, могат да се използват *in vitro* мутагенеза, "primer-pair", рестрикция или лигиране. При подходящи манипулации, като напр. рестрикция, "chewing-back" или допълване на натрупвания за "bluntends", комплементарните краища на фрагментите могат да бъдат на разположение за лигиране.

От особено значение за успеха на решението съгласно изобретението е прикачването на специфичен ER-задържащ сигнал SEKDEL (Schuoten, A. et al., *Plant Mol. Biol.* 30 (1996), 781-792), с което се утвърждава до четворява средната величина на експресията. За изграждане на касетата могат да бъдат въведени също и други задържащи сигнали, които обикновено са локализирани в ER растителни и животински протеини.

Предпочитаните полиаденилиращи сигнали са растителните полиаденилиращи сигнали, за предпочитане такива, които отговарят по същество на T-DNA-полиаденилиращи сигнали от *Agrobacterium tumefaciens*, особено отговарящите на ген-3 на T-DNA (Octopin Synthase) от Ti-плазмиди pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984) стр. 835 и следващи) или на техни функционални еквиваленти.

Една експресионна касета съгласно изобретението може да съдържа например конститутивен промотор (за предпочитане CaMV 35 S-промотор), LeB4-сигнален пептид, ген за експресия и ER-задържащ сигнал. Изграждането на касета е представено схематично на Фигура 2, например за едноверижно антитяло (scFv-Gen). Като ER-задържащ сигнал се използва за предпочитане аминокиселинната последователност KDEL (лизин, аспарагинова киселина, глутаминова киселина, левцин).

За предпочитане сливащата експресионна касета, която кодира за полипептид с хербицид-свързващи свойства е клонирана във вектор, например pBin19, който е подходящ да трансформира *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформираниите с такъв вектор агробактерии могат след това да се използват по познат начин за трансформиране на растения, по-специално на културни растения, като напр. тютюневи растения, при което напр. използваните листа или късчета от листа се промиват в бактериен разтвор и след това се култивират в подходяща среда. Трансформация на растения с акробактерии е позната между другото от публикацията на F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, издадена от S.D. Kung и R. Wu, Academic Press, 1993, стр. 15-38 и от публикацията на S.B. Gelvin, *Molecular Genetics of T-DNA Transfer from Agrobacterium to Plants*, публикувана също в *Transgenic Plants*, стр. 49-78. От трансформираниите клетки на използваните листа, съответно късове от листа, могат по познат начин да се регенерират трансгенни растения, които съдържат интегриран в касетата съгласно изобретението ген за експресия на полипептид с хербицид-свързващи свойства.



За трансформация на растение-гостоприемник с една, кодирана за хербицид-свързващ полипептид ДНК, се изгражда експресионна касета съгласно изобретението, въведена като инсерция в рекомбинантен вектор, чиято векторна ДНК съдържа допълнително функционални регулационни сигнали, например секвенции за репликация или интеграция. Подходящи вектори са описани между другото в "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, стр. 71-119 (1993).

При използване на цитираните по-горе рекомбинантни техники и техники за клониране, експресионните касети съгласно изобретението могат да се клонират в подходящи вектори, които да дават възможност за тяхното размножаване, напр. в *E. coli*. Подходящи клонирани вектори са между другото pBR332, pUC-сериите, M13mp-сериите и pA-CYC184. Особено подходящи са бинерни вектори, които могат да се реплицират както в *E. coli*, така и в агробактерии, като напр. pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711).

Друг обект на изобретението е използване на експресионни касети съгласно изобретението за трансформация на растения, растителни клетки, тъкани и части от растения. Цел на използването е за предпочитане създаване на резистентност срещу инхибитори на растителни ензими.

При това според избора на промоторите експресията се осъществява специфично в листата, в семената или в други части на растенията. Такива трансгенни растения, техни плодове, както и клетки, тъкани или части от растението, са друг обект на настоящето изобретение.

Пренасянето на чужди гени в генома на растение се нарича трансформация. При това се използват описаните методи за

трансформация и регенерация на растения от растителни тъкани и растителни клетки за провеждане на преходна или стабилна трансформация. Подходящи методи са трансформация на протопласти чрез полиетиленгликол-индуцирано приемане на ДНК, биолитично въвеждане на генканон, електропорообразуване, инкубиране на сухи ембриони в съдържащи ДНК разтвори, микроинжектиране и генен трансфер с помощта на агробактерия. Посочените методи са описани, напр. от B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, издадена от S.D. Kung и R. Wu, Academic Press, 1993, стр. 128-143, както и в *Portykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225). За предпочитане конструктът, който подлежи на експресия се клонира в един вектор, който е подходящ, за да се трансформира *Agrobacterium tumefaciens*, напр. pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984), 8711).

Трансформираниите с помощта на експресионната касета съгласно изобретението агробактерии могат след това по познат начин да се използват за трансформация на растения, по-специално на културни растения, като пшеница, царевица, соя, ориз, памук, захарна тръстика, канола, слънчоглед, лен, картофи, тютюн, домати, рапица, люцерна, салата и различни видове памук, ореховидни и лозя, напр. при което заболелите листа и листни късове си промиват в разтвор на агробактерии и след това се култивират в подходящ разтвор.

Функционално еквивалентни секвенции, които кодират хербицид-свързващ полипептид, съгласно изобретението, са такива секвенции, които освен различаващата се нуклеотидна секвенция имат други желани функционални групи. Функционалните еквиваленти обхващат по този начин природно наличните

варианти на описаните тук секвенции, както и изкуствени, които са получени напр. чрез химически синтез, пригодени за кодон-използване при растение, изкуствени нуклеотидни секвенции.

Под понятието функционални еквиваленти се разбират по-специално природни или изкуствени мутации на предварително изолирана кодираща хербицид-свързващ полипептид секвенция, която проявява освен това желана функция. Мутациите обхващат заместване, прибавяне делеция, замяна или инсерция на един или повече нуклеотидни участъка. Така например съгласно изобретението се обхващат също и такива нуклеотидни секвенции, които се получават чрез модификация на тези нуклеотидни секвенции. Цел на такава модификация може напр. да бъде следващо ограничаване на получената кодираща секвенция в него или напр. също включване на други места на късане от рестрикционни ензими.

Функционални еквиваленти са също такива варианти, чието действие е изравнено с изходния ген, съответно генни фрагменти с отслабено или усилено действие, в сравнение с изходния ген, съответно генен фрагмент.

Освен това са подходящи изкуствени ДНК секвенции, доколкото те, както е описано по-горе, индуцират желаната резистентност спрямо хербициди. Такива изкуствени ДНК секвенции могат напр. да проявят хербицид-свързваща активност при обратен повтор чрез молекулно моделиране на конструирани протеини или да бъдат получени чрез селекция *in-vitro*. Особено подходящи са кодиращи ДНК секвенции, които се получават чрез обратен повтор на полипептидна секвенция, съгласно специфично спрямо растението-гостоприемник използване на кодон. Специфично използване на кодон може лесно да се осъществи с познатите на

специалиста методи на генно инженерство при растения, чрез компютърно систематизиране на други познати гени за трансформиране на растения.

Като друга подходяща за използване съгласно изобретението еквивалентна секвенция на нуклеинова киселина трябва да се споменат секвенции, кодиращи слят протеин, при което съставната част на слетия протеин е част от хербицид-свързващ полипептид, който не е от растителен произход или част от негов функционален еквивалент. Втората част на слетия протеин може напр. да бъде друг полипептид с ензимна активност или една антиген полипептидна секвенция, с помощта на която е възможно доказването на scFvs експресия (напр. myc-tag или his-tag).

За предпочитане това се отнася до една регулативна протиенова секвенция, като напр. сигнален или транзитен пептид, който въвежда полипептида с хербицид-свързващи свойства на желаното място за действие.

Предмет на изобретението са обаче също получените съгласно изобретението експресионни продукти, както слети протеини от транзитен пептид и полипептид с хербицид-свързващи свойства.

Понятията резистентност, съответно поносимост в рамките на настоящето изобретение означава изкуствено придобита устойчивост срещу действието на растителни ензим-инхибитори. Тя обхваща частична и по-специално пълна нечувствителност срещу тези инхибитори с продължителност най-малко на една генерация на растението.

Първичното място на действие на хербицидите е обикновено растителната тъкан, така че специфична за листата експресия на екзогенни хербицид-свързващи полипептиди осигурява достатъчна

защита. Близък до това е все пак случаят, когато действието на хербицида не трябва да се ограничи само до тъканите на листата, а може да въздейства също върху всички други останали части от растението специфично спрямо тъканите.

Освен това конститутивната експресия на екзогенен хербицид-свързващ полипептид дава предимство. От друга страна може също една възможност за индуциране на експресия да бъде желателна.

Действието на трансгенни експресионни полипептиди с хербицид-свързващи свойства може да се установи напр. *in-vitro* чрез увеличаване на кълнове върху хербицид-съдържаща среда спрямо постепенно променяща се поредица от концентрации или чрез тестове с покълване на семена. При това определено растение може да се подложи на изпитания във вегетационна къща, за да се определи вида и големината на промяната в поносимостта спрямо хербициди.

Обект на изобретението са също така трансгенни растения, трансформирани с експресионна касета, съгласно изобретението, както и трансгенни клетки, тъкани, части и плодове от такива растения. Особено предпочитани при това са трансгенни културни растения, като напр. пшеница, царевица, соя, ориз, памук, захарна тръстика, канола, слънчоглед, лен, картофи, тютюн, домати, рапица, люцерна, салата и различни видове памук, ореховидни и лозя.

Трансгенните растения, растителни клетки, растителни тъкани или части от растения могат да се обработят с вещество, което инхибира растителните ензими, така че неуспешно трансформирани растения, растителни клетки, растителни тъкани или части от растения да бъдат унищожени.

Примери за подходящи активни вещества са по-специално 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина (Acifluorfen) и 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина (Quinmerac), както и метаболити и функционални производни на тези съединения. Кодиращата полипептид ДНК с хербицид-свързващи свойства, която се въвежда в експресионната касета съгласно изобретението, може да се използва също като селекционен маркер.

Особено при културни растения, настоящето изобретение осигурява предимството, че след индукция на селективна резистентност на културното растение спрямо растителни ензим-инхибитори, тези инхибитори могат да се използват като специфични хербициди срещу нерезистентни растения. Като примери на такива инхибитори могат да бъдат посочени следните хербицидно действащи съединения от групите б1 до б41, без изобретението да се ограничава до тях:

б1 1,3,4-тиадиазоли:

бутидазол, ципразол,

б2 амиди:

алидохлор (CDAA), бензоилпроп-етил, бромобутид, хлор-тиамид, димепиперат, диметенамид, дифенамид, етобензанид (бензхломет), флампроп-метил, фозамин, изоксабен, моналид, нафталам, пронамид (пропизамид), пропанил,

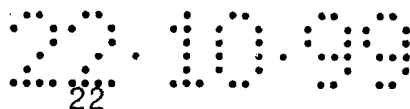
б3 аминоксфорни киселини:

биланафос (биалафос), буминафос, глуфозинат-амониум, глуфозат, сулфозат,

б4 аминотриазоли:

амитрол,

б5 анилиди:



анилофос, мефенасет

66 арилоксиалканови киселини:

2,4-D, 2,4-DB, хломепроп, дихлорпроп, дихлорпроп-Р, дихлорпроп-Р (2,4-DP-Р), фенопроп (2,4,5-TP), трифлуорооксипир, МСРА, МСРВ, мекопроп, мекопроп-Р, напропамид, напропанилид, трихлопир,

67 бензоени киселини:

хлорамбен, дикамба,

68 бензотиадиазинони:

бентазон,

69 избелвачи средства:

хломазон (диметазон), дифлуфеникан, флуорохлоридон, флупоксам, флуридон, пиразолат, сулкотрион (хлормезулон),

610 карбамати:

азулам, барбан, бутилат, карбетамида, хлорбуфам, хлорпрофам, циклоат, десмедифам, диалат, ЕРТС, еспрокарб, молинат, орбенкарб, пебулат, фенизофам, фенмедифам, профам, просулфокарб, пирибутикарб, сулфалат (CDEC), тербукарб, тиобенкарб (бентиокарб), тиокарбазил, триалат, фернолат,

611 хинолинови киселини:

хинхлорак, хинмерак,

612 хлорацетанилиди:

ацетохлор, алахлор, бутлахлор, бутенахлор, диетатил етил, диметлахлор, метазахлор, метолахлор, претилахлор, пропахлор, принахлор, тербухлор, тенилхлор, ксилахлор,

613 циклохексанони:

алоксидим, калоксидим, клетодим, клопроксидим, циклоксидим, сетоксидим, тралкоксидим, 2-{1-[2-(4-хлорфенокси)-

пропилоксиимино]бутил}'-3-гидрокси-5-(2Н-тетрахидротиопиран-3-ил)-2-циклохексен-1-он,

614 дихлорпропионови киселини:

далопон,

615 дихидробензофурани:

етофумезат,

616 дихидрофуран-3-они:

флуртамон,

617 динитроанилини:

бенефин, бутралин, динитрамин, еталфлуразин, флухло-  
ралин, изопропалин, нитралин, оризалин, пендиметалин, проди-  
амин, профлуралин, трифлуралин,

618 динитрофеноли:

бромофеноксим, диносеб, диносеб-ацетат, динотерб,  
DNOC,

619 дифенилетери:

ацифлуорфен-натрий, аклонифен, бифенокси, хлорнитро-  
фен (CNP), дифеноксурон, етоксифен, флуородифен, флуоро-  
гликофен-етил, фомезафен, фурилоксифен, лактофен, нитрофен,  
нитрофлоурфен, оксифлуорфен,

620 дипиридилен:

циперкват, дифензокват-метилсулфат, дикват, паракват  
дихлорид,

621 карбамиди:

бензтиазурон, бутурон, хлорбромурон, хлороксурон,  
хлортолурон, сумилурон, дибензилурон, циклурон, димефурон,  
диурон, димрон, етидимурон, фенурон, флуорметурон, изопр-  
турон, изоурон, карбутилат, линурон, метабензтиазурон,

метобензурон, метоксурон, монолинурон, монурон, небурон, сидурон, тебутиурон, триметурон,

622 имидазоли:

изокарбамид,

623 имидазолинони:

имаземетапир, имазапир, имазаквин, имазетабенз-метил (имазам), имазетапир,

624 оксадиазоли:

метазол, оксадиаргил, оксадиазон,

625 оксирани:

тридифан,

626 феноли:

бромоксинил, йоксинил,

627 естери на феноксифеноксипропионовата киселина:

клодинафор, циналофоп-бутил, диклфоп-метил, феноксапропетил, феноксапроп-р-етил, фентиапропетил, флуазифоп-бутил, флуазифоп-р-бутил, халоксифоп-етоксиетил, халоксифоп-метил, халоксифоп-р-метил, изоксапирифоп, пропаквизафоп, квизалофоп-етил, квизалофоп-р-етил, квизалофоп-тефурил,

628 фенилоцетна киселина:

хлорфенак (фенак),

629 фенилпропионови киселини:

хлорофенпроп-метил,

630 протопорфириноген-IX-оксидазни инхибитори:

бензофенап, синидон-етил, флумихлорак-пентил, флумиоксазин, флумипропил, флупропацил, флутиацет-метил, пиразоксифен, сулфентразон, тидиазимин,

631 пиразоли:

нипираклофен,

## 632 пиридазини:

хлоридазон, малеинхидразид, норфлуразон, пиридат,

## 633 пиридинкарбоксилни киселини

хлопиралид, дитиопир, пиклорам, тиазопир,

## 634 пиримидилови етери:

пиритиобак-киселина, пиритиобак-натрий, КИН-2023, КИН-6127,

## 635 сулфонамиди:

флуметсулам, метосулам,

## 636 сулфонилкарбамиди:

амидосулфурон, азидсулфурон, бенсулфурон-метил, хлоримуронетил, хлорсулфурон, циносулфурон, циклосулфамурон, етаметсулфурон метил, етоксисулфурон, флазасулфурон, халосулфурон-метил, имазосулфурон, метсулфурон-метил, никосулфурон, примисулфурон, просулфурон, пиразосулфурон-етил, римсулфурон, сулфометурон-метил, трифенсулфурон-метил, триасулфурон, трибенурон-метил, трифлусулфурон-метил,

## 637 триазини:

аметрин, атразин, азипротрин, циназин, ципразин, дезметрин, диметаметрин, дипропетрин, еглиназин-етил, хексазинон, проциазин, прометон, прометрин, пропазин, секбуметон, симазин, симетрин, тербуметон, тербутрин, тербутилазин, ритазин,

## 638 триазинони:

етиозин, метамитрон, метрибузин,

## 639 триазолкарбоксамиди:

триазофенамид,

## 640 урацили:

бромацил, ленацил, тербацил,

## 641 различни:

641 различни:

беназолин, бенфурезат, бенсулид, бензофлуор, бутамифос, кафенстрол, хлортал-диметил (ДСРА), цинметилин, дихлобенил, ендотал, флуорбентранил, мефлуидид, перфлуидон, пиперофос.

Функционално еквивалентните производни на растителни ензим-инхибитори притежават сравним спектър на действие, както конкретно посочените съединения, при по-ниска, еднаква или по-висока инхибиторна активност (напр. изразена в g инхибитор на хектар обработваема площ, необходими за пълно подтискане на растежа на нерезистентни растения).

Примери за изпълнение на изобретението

Изобретението се пояснява от следващите примери, без да се ограничава до тях.

Общ метод на клониране

Етапите на клониране, провеждани в рамките на настоящето изобретение, като напр. рестрикционни отцепвания, агарозна-гел-електрофореза, пречистване на ДНК-фрагменти, трансфер на нуклеинови киселини върху нитроцелулоза и найлонови (полиамидни) мембрани, свързване на ДНК-фрагменти, трансформация на клетки от *E. coli*, отглеждане на бактерии, размножаване на фаги и секвенц-анализ на рекомбинантна ДНК се провеждат по начина, описан от Sambrook et al., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6).

Използваните по-долу бактериални щамове (*E. coli*, XL-1 Blue) се взимат от Stratagene. Използваните за растителна трансформация агробактерийни щамове (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 с

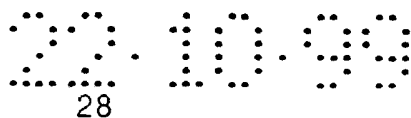
плазмид pGV2260 или pGV3850kan) са описани от Deblaere et al., (Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777). Алтернативно могат да се използват също агробактериен щам LBA4404 (Clontech) или други подходящи щамове. За клониране се използват векторите pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119), pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acides Res. 12(1984) 8711-8720) и pBinAR (Hoefgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230).

#### Секвенционен анализ на рекомбинантна ДНК

Секвенирането на рекомбинантна ДНК молекула се провежда с уред за ДНК-секвениране чрез лазерна флуоресценция на фирмата Pharmacia, по метода на Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977), 5463-5467).

#### Получаване на растителна експресионна касета

В плазмид pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12, 8711 (1984)) се вметва (инсерция) 35S CaMV промотор като EcoRI-KpnI-фрагмент (отговарящ на нуклеотиди 6909-7437 на Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285). Полиаденилиращ сигнал на ген 3 на T-DNA на Ti-плазмидата pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835). Нуклеотидът 11794-11939 се изолира като PvuII-HindIII-фрагмент и след прибавяне на SphI-свързваща ДНК се клонира към рестрикционно място PvuII, между SphI-HindIII рестрикционно място на вектора. При това се получава плазмид pBi-nAR (Hoefgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230).



## Примери за използване

### Пример 1

Тъй като хербицидите не са имуногенни, те трябва да се свържат с носител, като напр. KLH. Това свързване може да се проведе директно, ако в молекулата има функционална група, иначе по време на синтезата на хербицида ще трябва да се въведе функционална група или да се намери реактивоспособен предварителен етап по време на синтезата, така че тази молекула да се свърже в един прост реакционен етап. Примери за начини на свързване са описани от Miroslavic Ferencik в "Handbook of Immunochemistry", 1993, Chapman & Hall, Kapitel Antigene, стр. 20-49.

Чрез повтарящо се инжектиране на тази модифицирана носеща молекула (антиген) се имунизират напр. Balb/c-мишки. Тъй като в серума има достатъчно антитела с връзка към антиген, които могат да се докажат по метода ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), то се взимат клетки от далака на тези животни и се сливат с миеломни клетки, за да се култивира хибрид. ELISA се използва по-нататък като антиген "хербицид-модифициран BSA", за да се разграничат насоченият спрямо Napten имунен отговор от този, насочен спрямо KLH-отговора.

Получаването на моноклонални антитела се провежда, като се следват познатите методи, напр. описани в "Practical Immunology", Leslie Hudson und Frank Hay, Blackwell Scientific Publications, 1989, или в "Monoclonal antibodies: Principles and Practice", James Goding, 1983, Academic Press, Inc., или в "A practical guide to monoclonal antibodies", J. Liddell und A. Cryer, 1991, John Wiley&Sons; или Achim Moeller und Franz Emling

"Monoklonale Antikoerper gegen TNF und deren Verwendung".  
Патентно описание EP-A260610.

### Пример 2

Изходна точка на изследването е моноклонално антитяло, което различава специфично хербицида Quinmerac и което освен това показва висок свързващ афинитет. Селекционираните хибридомни клетъчни линии се характеризират с това, че секретираните насочени срещу хербицидния антиген Quinmerac моноклонални антитела проявяват висок афинитет и са на разположение специфичните секвенции на имуноглобулин (Berek, C. et al., Nature 316, 412-418 (1985)). Това моноклонално антитяло срещу Quinmerac е изходна точка за конструкция на едноверижен антитяло фрагмент (scFv-antiQuinmerac).

Най-напред се изолира mRNA от хибридомни клетки и се вписва в кДНК. Тази кДНК служат като матрици за амплификация на вариращи имуноглобулини VH и VK със специфични Primern VH1 BACK и VH FOR-2 за тежки вериги, както и VK2 BACK и MJK5 FON X за леки вериги (Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). Изолираните вариращи имуноглобулини са изходна точка за конструкция на едноверижно-антитяло фрагмент (scFv-antiQuinmerac). При следващата фузия по метода PCR три компонента VH, VK и свързващ фрагмент се обединяват в една PCR-реакционна вставка и scFv-antiQuinmerac се амплифицира (Фиг. 3).

Функционалната характеристика (антигенсвързваща активност) на конструируания scFv-antiQuinmerac-ген се извършва чрез експресия на бактериална система. При това се синтезира scFv-antiQuinmerac по метода на Hoogenboom, H.R. et al., Nucleic Acids Research, 19, 4133-4137 (1991) като разтворим фрагмент от

антитяло в *E. coli*. Активността и специфичността на конструирания фрагмент от антитяло се определя чрез теста ELISA (Фиг.4).

За да стане възможно провеждане на семе-специфична експресия на фрагмент от антитяло в тютюн се клонира scFv-antiQuinmerac-ген по посока надолу от LeB4-промотора. Изолираният от *Vicia faba* LeB4-промотор проявява силна семе-специфична експресия на различни чужди гени в тютюн (Baumelein, H. et. al., Mol. Gen. Genet., 225, 121-128 (1991)). Чрез транспорт на scFv-antiQuinmerac полипептида в ендоплазматичния ретикулум се постига стабилно натрупване на високи количества от фрагменти от антитяло. Генът scFv-antiQuinmerac се слива за тази цел със сигнал-пептидна секвенция, която осигурява входа в ендоплазматичния ретикулум и на ER-задържащия сигнал SEKDEL, който осигурява задържане в ER (Wandelt et al., 1992), (Фиг. 5).

Конструираната експресионна касета се клонира в бинерния вектор pGSG LUC 1 (Saito et al., 1990) и се пренася чрез електропорообразуване в *Agrobacterium*-Stamm EHA 101. Рекомбинантният агробактериен клон се използва за следващата трансформация на *Nicotiana tabacum*. За конструкт се регенерират 70-140 тютюневи растения. От регенерираните трансгенни тютюневи растения се събират семена в различни стадии на развитие при оплождане по естествен начин. От тези семена се получават разтворими протеини след екстракция във водна буферна система. Анализът на трансгенни растения показва, че чрез сливане на scFv-antiQuinmerac ген с ДНК-секвенция на ER-задържащия сигнал SEKDEL може да се получи максимално натрупване от 1.9 % scFv-antiQuinmerac протеин в узрели семена.



Конструираният scFv-antiQuinmerac ген има големина от около 735 bp. Вариращите домени са слети един с друг в последователност VH-L-VL.

Специфичната селективност се определя в екстракти на узрели семена от тютюн чрез директен тест ELISA. Получените при това стойности показват ясно, че протеиновите екстракти съдържат функционалноактивни фрагменти от антитела.

### Пример 3

Специфична за семена експресия и обогатяване на еднове-рижни фрагменти от антитяло в ендоплазматичен ретикулум от клетки на трансгенни тютюневи семена, контролирана от USP-промотор

Исходната точка на изследването е еднове-рижен фрагмент от антитяло срещу хербицида Quinmerac (scFv-antiQuinmerac). Функционалното характеризиране (активност на свързването на антиген) на този конструиран scFv-antiQuinmerac-ген се провежда след експресия в бактериална система и след експресия в листа от тютюн. Активността и специфичността на конструираните фрагменти от антитяло се определят чрез тест ELISA.

За да се осъществи специфична спрямо семена експресия на фрагменти от антитела в тютюн се клонира scFv-antiQuinmerac-ген по направление надолу от USP-промотор. Изолираният от *Vicia faba* USP-промотор проявява силна специфична спрямо семена експресия на различни чужди гени в тютюн (Fiedler, U. et al., Plant Mol. Biol. 22, 669-679 (1993)). Чрез пренос на scFv-antiQuinmerac полипептида в ендоплазматичния ретикулум се постига стабилно натрупване на високи количества от фрагменти от антитяло. Генът scFv-antiQuinmerac се слива за тази цел със

сигнал-пептидна секвенция, която осигурява входа в ендоплазматичния ретикулум и на ER-задържащия сигнал SEKDEL, който осигурява задържане в ER (Wandelt et al., 1992), (Фиг. 1).

Конструираната експресионна касета се клонира в бинерния вектор pGSGLOC 1 (Saito et al., 1990) и се пренася чрез електропорообразуване в *Agrobacterium-Stamm EHA 101*. Рекомбинантният агробактериен клон се използва за следващата трансформация на *Nicotiana tabacum*. От регенерираните трансгенни тютюневи растения се събират семена в различни стадии на развитие при оплождане по естествен начин. От тези семена се получават разтворими протеини след екстракция във водна буферна система. Анализът на трансгенни растения показва, че чрез сливане на scFv-antiQuinmerac-ген с ДНК-секвенция на ER-задържащия сигнал SEKDEL под контрола на USP-промотор вече след ден 10 на развитие на семената се синтезират едноверижни фрагменти, със свързващ афинитет спрямо Quinmerac.

#### Пример 4

За получаване на юбиквитерна експресия на фрагменти от антитела в растения, специално в листа се клонира scFv-anti-Quinmerac-ген по направление надолу от CaMV 35 S-промотор. Този силно конституитивен промотор предизвиква експресия на чужди гени почти във всички растителни тъкани (Benfey und Chua, Science 250, (1990), 956-966). Чрез пренос на scFv-antiQuinmerac протеина в ендоплазматичния ретикулум се постига стабилно натрупване на високи количества от фрагменти от антитяло в листния материал. Генът scFv-antiQuinmerac се слива за тази цел със сигнал-пептидна секвенция, която осигурява входа в ендоплазматичния ретикулум и на ER-задържащия сигнал KDEL,

който осигурява задържане в ER (Wandelt et al., Plant J. 2 (1992), 181-192). Конструираната експресионна касета се клонира в бинерния вектор pGSGLOC 1 (Saito et al., Plant Cell Rep. 8 (1990), 718-721) и се пренася чрез електропорообразуване в *Agrobacterium-Stamm EHA 101*. Рекомбинантният агробактериен клон се използва за следващата трансформация на *Nicotiana tabacum*. Регенерират се около 100 тютюневи растения. От регенерираните трансгенни тютюневи растения се събира растителен материал. От този растителен материал се получават разтворими протеини след екстракция във водна буферна система. Следващите анализи (Western-Blot-анализи и тестове ELISA) показват, че в листата може да се получи максимално натрупване от 2 % биологично активен антиген-свързващ scFv-antiQuinmerac протеин. Високите стойности на експресия се развиват в развити зелени листа, но също така в чувствителен листен материал може да се докаже наличие на фрагменти от антитела.

#### Пример 5

PCR-приложение на фрагмент от кДНК, кодираща едноверижно антитяло срещу Acifluorfen, съответно Quinmerac, с помощта на синтетични олигонуклеиди

PCR-приложението на едноверижно антитяло кДНК се провежда в апарат DNA-Thermal Cycler на фирмата Perkin Elmer. Реакционната смес, съдържаща 8 ng/ $\mu$ l едноверижна матрична-кДНК, 0.5  $\mu$ M от съответните олигонуклеиди, 200  $\mu$ M нуклеотиди (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 при 25°C, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) и 0.02 U/ $\mu$ l Taq полимераза (Perkin Elmer). Условиата за приложение са следните:

Температура на съхранение	45°C
Температура за денатуриране	94°C
Температура за елонгация	72°C
Брой на циклите:	40

В резултат се получава фрагмент с около 735 основни двойки, който се лигира във вектор pBluescript. С лигирането се трансформира *E. coli* XL-I Blue и протича амплификация на плазмида. За приложение и оптимизиране на полимеразната верижна реакция виж: Innes et al., 1990, PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press.

#### Пример 6

Получаване на трансгенни тютюневи растения, които експесират кДНК, кодираща едноверижно антитяло с хербицид-свързващи свойства

Плазмидът pGSGLOC 1 се трансформира в *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260. За трансформация на тютюневи растения (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) се използва 1:50 разреждане на култура, престояла една нощ от положително трансформирана колония на агробактерии в среда Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15 (1962), 473 и следващи) с 2 % захароза (2MS-среда). Листни отрезки от стерилни растения (всяко едно около 1 cm<sup>2</sup>) се инкубират в продължение на 5 до 10 минути в съдче на Петри, при разреждане на агробактериите 1:50. Следва инкубиране в продължение на 2 дни на тъмно при 25°C върху 2MS-среда с 0.8 Vacto-Agar. Култивирането се провежда по-нататък след 2 дни в продължение на 16 часа на светлина и 8 часа на тъмно и след това се продължава в седмичен ритъм върху MS-среда с 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l

канамицин, 1 mg/l бензиламинопури (BAP), 0.2 mg/l нафтилоцетна киселина и 1.6 g/l глюкоза. Растящите филизи се прехвърлят в MS-среда с 2 % захароза, 250 mg/l Claforan и 0.8 % Vacto-Agar.

### Пример 7

Стабилно натрупване на едноверижни фрагменти от антитяло срещу хербицида Quinmerac в ендоплазматичен ретикулум

Исходна точка на изследването е експресията в тютюневи растения едноверижен фрагмент от антитяло срещу хербицида Quinmerac (scFv-anti Quinmerac). Количеството и активността на синтезираните scFv-anti Quinmerac-полипептиди се определят чрез Western-Blot-анализи и тестове ELISA.

За да се даде възможност за експресия на scFv-antiQuinmerac ген в ендоплазматичен ретикулум се експресират чужди гени под контрола на CaMV 35 S-промотор, като транслационно сливане с LeV4-сигнален пептид (N-края) и ER-задържащ сигнал KDEL (C-края). Чрез транспорт на scFv-antiQuinmerac-полипептида в ендоплазматичния ретикулум се постига стабилно натрупване на високи количества фрагменти от антитяло в листата. След отстраняване на растителния материал, късовете се замразяват при  $-20^{\circ}\text{C}$  (1), лиофилизират (2) или се сушат при стайна температура (3). Разтворимите протеини се получават от съответния листен материал чрез екстракция с воден буфер и scFv-antiQuinmerac-полипептидът се пречисва чрез афинитетна хроматография. Еднакви количества от пречистените scFv-antiQuinmerac полипептиди (след замръзване, лиофилизиране и сушене) се използват за определяне на активността на фрагментите от антитяло (Фиг. 6). На Фиг. 6А е показана активността за свързване на антиген на пречистени scFv-antiQuinmerac

полипептиди от свежи (1), лиофилизирани (2) и изсушени (3) листа. На Фиг. 6А са дадени съответните количества scFv-antiQuinmerac-протеин (около 100 ng), определени чрез тестове ELISA и Western-Blot-анализи. Величините на стандартите за протеин-молекулно тегло са представени в ляво. При това се установява почти еднаква антиген-свързваща активност.

#### Пример 8

За доказване на поносимостта спрямо хербициди на трансгенни тютюневи растения, продуциращи полипептид с хербицид-свързващи свойства, те се обработват с различни количества от хербицидите Acifluorfen и съответно Quinmerac. Във всички случаи е доказано във вегетационна къща, че scFv-antiAcifluorfen, съответно scFv-antiQuinmerac експресиращите растения проявяват поносимост срещу съответните хербициди в сравнение с контролите.

22.10.99

900.99-ПБ

Патентни претенции

1. Метод за получаване на растения, с поносимост спрямо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно спрямо 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, чрез експресия в растенията на екзогенно антиляло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина.
2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че екзогенното антиляло е фрагмент от едноверижно антиляло.
3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че екзогенното антиляло е цяло антиляло или фрагмент от антиляло.
4. Метод съгласно претенции 1 до 3, характеризиращ се с това, че растението е едносеменделно или двусеменделно.
5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че растението е тютюн.
6. Метод съгласно претенции 1-5, характеризиращ се с това, че експресията на екзогенно антиляло се провежда конститутивно в растението.
7. Метод съгласно претенции 1-5, характеризиращ се с това, че експресията на екзогенно антиляло се индуцира в растението.
8. Метод съгласно претенции 1-5, характеризиращ се с това, че експресията на екзогенно антиляло се провежда в листата на растението.
9. Метод съгласно претенции 1-5, характеризиращ се с това, че експресията на екзогенно антиляло се провежда в семената на растението.

10. Експресионна касета за растения, характеризираща се с това, че се състои от промотор, сигнален пептид, ген, кодиращ експресия на екзогенно антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, ER-задържач сигнал и терминатор.

11. Експресионна касета съгласно претенция 10, характеризираща се с това, че като конститутивен промотор се използва CaMV 35S-промотор.

12. Експресионна касета съгласно претенция 10, характеризираща се с това, че като ген за експресия се въвежда едноверижен фрагмент от антитяло.

13. Експресионна касета съгласно претенция 10, характеризираща се с това, че като ген за експресия се въвежда едноверижен фрагмент от антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, за транслационно сливане с други функционални протеини, напр. ензими, токсини, хромофори и свързани протеини.

14. Експресионна касета съгласно претенция 10, характеризираща се с това, че антителата за експресия се получават от хибридомни клетки или с помощта на други рекомбинантни методи - като напр. по метода антитяло-Phage-Display.

15. Използване на експресионна касета съгласно претенция 10 за трансформация на едноседелни и двуседелни растения, които експресират конститутивно семе- или лист-специфично екзогенно антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина.

16. Използване съгласно претенция 15, характеризиращо се с това, че експресионната касета трансферира бактериен щам и създаденият рекомбинантен клон се използва за трансформация на едноседелни и двуседелни растения, които експресират конститутивно семе- или лист-специфично екзогенно антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина.

17. Използване на експресионна касета съгласно претенция 10 като селекционен маркер.

18. Използване на растение, което съдържа експресионна касета съгласно претенции 10 до 14, за получаване на антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина.

19. Метод за трансформация на растение, чрез въвеждане на секвенция, която кодира антитяло, свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, в растителна клетка, в калусна тъкан, в цялото растение и протопласти на растителни клетки.

20. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че трансформацията се провежда с помощта на агробактерия, поспециално от вида *Agrobacterium tumefaciens*.

21. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че трансформацията се провежда чрез електропорообразуване.

22. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че трансформацията се провежда с помощта на метода на бомбандиране с частици.

23. Метод за получаване на свързващо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина антитяло, чрез експресия на ген, кодиращ такова антитяло в растение, съответно в клетки на растение и следващо изолиране на антитялото.

24. Растение, съдържащо експресионна касета съгласно претенция 10, характеризиращо се с това, че експресионната касета осигурява поносимост на растението спрямо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина.

25. Метод за борба с нежелана растителност в трансгенни, резистентни спрямо 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, характеризиращо се с това, че се въвеждат хербицидите 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, съответно 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, срещу които културното растение изгражда свързващи антители.

26. Антитяло, с афинитет за свързване на 5-(2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси)-2-нитробензоена киселина, характеризиращо се с това, че е получено съгласно претенция 23.

27. Антитяло, с афинитет за свързване на 7-хлор-3-метилхинолин-8-карбоксилна киселина, характеризиращо се с това, че е получено съгласно претенция 23.