



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124757** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

C12N 5/14 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/32 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

A01H 6/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2017 04588</p> <p>(22) Дата подання заявки: 09.10.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 18.11.2021</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/064,848</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 16.10.2014</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.07.2017, Бюл.№ 14</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 17.11.2021, Бюл.№ 46</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2015/054869, 09.10.2015</p>	<p>(72) Винахідник(и): Абад Андре Р. (US), Кроу Ендрю К. (US), Поланд Бред (US), Ши Сяомей (US), Вулф Томас Ч. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТНЛ, ІНК., 7100 N.W. 62nd Avenue, Johnston, Iowa 50131-1014, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр. №194</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2014138339 A2, 12 09.2014</p>
--	--

(54) ІНСЕКТИЦИДНИЙ ПОЛІПЕПТИД ПРОТИ ЛУСКОКРИЛОГО АБО ТВЕРДОКРИЛОГО ШКІДНИКА ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується нуклеїнової кислоти, одержаної із штаму *Bacillus thuringiensis*, який кодує поліпептид з інсектицидною активністю щодо комах-шкідників, у тому числі *Lepidoptera* та *Coleoptera*, інсектицидної композиції, рослини, що містить таку нуклеїнову кислоту, та їх застосування в способах контролю лускокрилого та твердокрилого шкідників рослин.

UA 124757 C2

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕНИЙ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Перелік послідовностей із назвою файла "6059WOPCT_sequence_listing", створений 20 серпня 2015 року та розміром 53 кілобайти, подається у машиночитальній формі одночасно з даним описом. Перелік послідовностей є частиною даного опису та включений у даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті.

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Дане розкриття відноситься до нуклеїнових кислот, що зустрічаються в природних умовах, та рекомбінантних нуклеїнових кислот, одержаних із нових генів *Bacillus thuringiensis*, які кодуєть пестицидні поліпептиди, що характеризуються пестицидною активністю щодо комах-шкідників. У композиціях та способах згідно з даним винаходом використовуються розкриті нуклеїнові кислоти та пестицидні поліпептиди, що кодується ними, для контролю шкідників рослин.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Комахи-шкідники є основним фактором, що завдає шкоди сільськогосподарським культурам у світі. Наприклад, живлення совок, пошкодження совкою-іпсилон або пошкодження вогнівкою кукурудзяною можуть бути спустошувальними в економічному плані для сільськогосподарських виробників. Пов'язана з комахою-шкідником шкода, зумовлена нападами вогнівки кукурудзяної тільки на польову та солодку кукурудзу, досягла приблизно одного мільярда доларів на рік за збитками внаслідок пошкодження та витратами на контроль.

Традиційно головним способом впливу на популяції комах-шкідників є застосування хімічних інсектицидів широкого спектра дії. Проте споживачі, а також органи державного регулювання стають все більш стурбованими ризиком несприятливого впливу на довкілля, пов'язаного з одержанням та застосуванням синтетичних хімічних пестицидів. Унаслідок таких побоювань органи державного регулювання заборонили або обмежили застосування деяких із більш небезпечних пестицидів. Таким чином, розробка альтернативних пестицидів становить значний інтерес.

Біологічний контроль комах-шкідників, що мають сільськогосподарське значення, із застосуванням мікробного агента, такого як гриби, бактерії або інші види комах, являє собою альтернативу синтетичним хімічним пестицидам, яка не справляє негативного впливу на довкілля та є привабливою з комерційного погляду. Загалом можна сказати, що застосування біопестицидів викликає менший ризик забруднення та несприятливих впливів на довкілля та біопестициди забезпечують більшу специфічність щодо мішені, ніж та, яка притаманна традиційним хімічним інсектицидам широкого спектра дії. Крім того, найчастіше виробництво біопестицидів коштує дешевше, та, внаслідок цього, поліпшується економічно ефективний вихід продукції для широкого спектра сільськогосподарських культур.

Певні види мікроорганізмів із роду *Bacillus*, як відомо, мають пестицидну активність щодо широкого спектра комах-шкідників, у тому числі *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* та інших. *Bacillus thuringiensis* (Bt) та *Bacillus papilliae* відносяться до найбільш успішних засобів біологічного контролю, виявлених на сьогодні. Патогенність щодо комах також приписували штамам *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* (Harwood, ed., ((1989) *Bacillus* (Plenum Press), 306) та *B. cereus* (WO 96/10083). Як з'ясувалося, пестицидна активність сконцентрована у параспоральних кристалічних білкових включеннях, хоча пестицидні білки також були виділені з *Bacillus* на вегетативній стадії росту. Декілька генів, що кодуєть ці пестицидні білки, були виділені та охарактеризовані (див., наприклад, патенти США №№ 5366892 та 5840868).

Мікробні інсектициди, зокрема одержані зі штамів *Bacillus*, відіграють важливу роль у сільському господарстві як альтернатива хімічному контролю шкідників. Нещодавно науковці, які працюють у галузі сільського господарства, створили культурні рослини з поліпшеною стійкістю до комах за допомогою генної інженерії культурних рослин, так щоб вони продукували пестицидні білки, що походять із *Bacillus*. Наприклад, за допомогою генної інженерії були створені рослини кукурудзи та бавовнику для продукування пестицидних білків, виділених із штамів Bt (див., наприклад, Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59(3):417-425; Schnepf et al. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3):775-806). Ці сільськогосподарські культури, створені за допомогою генної інженерії, на сьогодні широко застосовуються в американському сільському господарстві та надають фермеру альтернативу традиційним способам контролю комах, яка не чинить негативного впливу на довкілля. Крім того, різновиди картоплі, змінені за допомогою генної інженерії таким чином, щоб вони містили пестицидні Cry-токсини, реалізовувалися американськими фермерами. Незважаючи на те, що вони були визнані дуже комерційно успішними, ці створені за допомогою генної інженерії стійкі до комах культурні рослини забезпечують стійкість тільки до вузького діапазону економічно важливих комах-шкідників.

Відповідно, залишається потреба у нових токсинах Bt з більш широким спектром інсектицидної активності щодо комах-шкідників, наприклад, токсинах, активних щодо більшого діапазону комах із ряду Lepidoptera. Крім того, залишається потреба у біопестицидах, які мають активність щодо деякого діапазону комах-шкідників, та в біопестицидах, які мають поліпшену інсектицидну активність.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Передбачаються композиції та способи здійснення впливу на комах-шкідників. Більш конкретно варіанти здійснення даного винаходу відносяться до способів здійснення впливу на комах із використанням нуклеотидних послідовностей, що кодують інсектицидні пептиди, для одержання трансформованих мікроорганізмів та рослин, які експресують інсектицидний поліпептид згідно з варіантами здійснення. У деяких варіантах здійснення нуклеотидні послідовності кодують поліпептиди, що є пестицидними щонайменше для однієї комахи, яка належить до ряду Lepidoptera.

Варіанти здійснення передбачають молекули нуклеїнової кислоти, а також їх фрагменти та варіанти, які кодують поліпептиди, що мають пестицидну активність щодо комах-шкідників (наприклад, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 9). Нуклеотидна послідовність дикого типу (наприклад, що зустрічається в природних умовах) згідно з варіантами здійснення, яка була одержана з Bt, кодує інсектицидний пептид. Варіанти здійснення додатково передбачають фрагменти та варіанти розкритої нуклеотидної послідовності, які кодують біологічно активні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди.

Варіанти здійснення додатково передбачають виділені пестицидні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди, які кодуються або нуклеїновою кислотою, що зустрічається в природних умовах, або модифікованою (наприклад, підданою мутагенезу або маніпуляції) нуклеїновою кислотою згідно з варіантами здійснення. У конкретних прикладах пестицидні білки згідно з варіантами здійснення включають фрагменти білків та поліпептидів повної довжини, що одержані з нуклеїнових кислот, підданих мутагенезу, сконструйованих для введення конкретних амінокислотних послідовностей у поліпептиди згідно з варіантами здійснення. У конкретних варіантах здійснення поліпептиди мають посилену пестицидну активність порівняно з активністю поліпептиду, що зустрічається в природних умовах, з якого вони одержані.

Нуклеїнові кислоти згідно з варіантами здійснення також можна застосовувати для одержання трансгенних (наприклад, трансформованих) однодольних або дводольних рослин, які характеризуються геномами, що містять щонайменше одну стабільно вбудовану нуклеотидну конструкцію, що містить кодувальну послідовність згідно з варіантами здійснення, функціонально пов'язану з промотором, який керує експресією кодованого пестицидного поліпептиду. Відповідно, також передбачаються трансформовані рослинні клітини, тканини рослин, рослини та їхнє насіння.

У конкретному варіанті здійснення трансформовану рослину можна одержати із застосуванням нуклеїнової кислоти, що була оптимізована для підвищеної експресії у рослині-хазяїні. Наприклад, один із пестицидних поліпептидів згідно з варіантами здійснення може бути відтворений за поліпептидною послідовністю з одержанням нуклеїнової кислоти, що містить кодони, оптимізовані для експресії у конкретному хазяїні, наприклад, у культурній рослині, такій як рослина кукурудзи (*Zea mays*). Експресія кодувальної послідовності такою трансформованою рослиною (наприклад, дводольною або однодольною) буде приводити в результаті до продукування пестицидного поліпептиду та надавати рослині підвищену стійкість до комах. Деякі варіанти здійснення передбачають трансгенні рослини, що експресують пестицидні поліпептиди, які знаходять застосування у способах здійснення впливу на різних комах-шкідників.

Варіанти здійснення додатково включають пестицидні або інсектицидні композиції, що містять інсектицидні поліпептиди згідно з варіантами здійснення, та при цьому вони необов'язково можуть містити додаткові інсектицидні пептиди. Варіанти здійснення охоплюють застосування таких композицій щодо середовища існування комах-шкідників з метою впливу на комах-шкідників.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Варіанти здійснення даного винаходу спрямовані на композиції та способи здійснення впливу на комах-шкідників, особливо на шкідників рослин. Більш конкретно, виділена нуклеїнова кислота згідно з варіантами здійснення, а також її фрагменти та варіанти містять нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні поліпептиди (наприклад, білки). Розкриті пестицидні білки є біологічно активними (наприклад, пестицидними) щодо комах-шкідників, таких як, без обмеження, комахи-шкідники ряду Lepidoptera.

Композиції згідно з варіантами здійснення передбачають виділені нуклеїнові кислоти, а

також їхні фрагменти та варіанти, які кодують пестицидні поліпептиди, касети експресії, що містять нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення, виділені пестицидні білки та пестицидні композиції. Деякі варіанти здійснення передбачають модифіковані пестицидні поліпептиди, що мають поліпшену інсектицидну активність щодо лускокрилих порівняно з пестицидною активністю відповідного білка дикого типу. Варіанти здійснення додатково передбачають рослини та мікроорганізми, трансформовані цими новими нуклеїновими кислотами, та способи, що включають застосування таких нуклеїнових кислот, пестицидних композицій, трансформованих організмів та продуктів з них при здійсненні впливу на комах-шкідників.

Нуклеїнові кислоти та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення можна застосовувати для трансформації будь-якого організму для продукування пестицидних білків, що кодуються ними. Передбачаються способи, які включають застосування таких трансформованих організмів для впливу на шкідників рослин або для їх контролю. Нуклеїнові кислоти та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення можна також застосовувати для трансформації органел, таких як хлоропласти (McBride et al. (1995) *Biotechnology* 13: 362-365 та Kota et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1840-1845).

Крім цього, варіанти здійснення відносяться до ідентифікації фрагментів та варіантів кодувальної послідовності, що зустрічається в природних умовах, які кодують біологічно активні пестицидні білки. Нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення знаходять безпосереднє застосування у способах здійснення впливу на шкідників, особливо на комах-шкідників, таких як шкідники з ряду *Lepidoptera*. Відповідно, варіанти здійснення передбачають нові підходи до здійснення впливу на комах-шкідників, які не залежать від застосування традиційних синтетичних хімічних інсектицидів. Варіанти здійснення передбачають виявлення біорозкладаних пестицидів, що зустрічаються в природних умовах, та генів, які їх кодують.

Варіанти здійснення додатково передбачають фрагменти та варіанти кодувальної послідовності, що зустрічається в природних умовах, які також кодують біологічно активні (наприклад, пестицидні) поліпептиди. Нуклеїнові кислоти згідно з варіантами здійснення охоплюють послідовності нуклеїнової кислоти або нуклеотидні послідовності, які були оптимізовані для експресії клітинами конкретного організму, наприклад, послідовності нуклеїнової кислоти, які були відтворені за поліпептидною послідовністю (тобто піддані "зворотній трансляції") із застосуванням переважних для рослин кодонів, виходячи з амінокислотної послідовності поліпептиду з посиленою пестицидною активністю. Варіанти здійснення додатково передбачають мутації, які надають поліпшених або змінених властивостей поліпептидам згідно з варіантами здійснення. Див., наприклад, патент США № 7462760.

У подальшому описі широко застосовується ряд виразів. Наступні визначення представлені для спрощення розуміння варіантів здійснення.

Одиниці вимірювання, префікси та символи можна позначити у формі, прийнятій у системі SI. Якщо не вказано інше, нуклеїнові кислоти записані зліва направо в орієнтації від 5' до 3'; амінокислотні послідовності записані, відповідно, зліва направо у напрямку від аміногрупи до карбоксигрупи. Числові діапазони включають числа, що визначають діапазон. Амінокислоти в даному документі можуть бути названі або за їхніми загальновідомими трилітерними символами, або за однопітерними символами, рекомендованими комісією з біохімічної номенклатури IUPAC-IUB. Нуклеотиди, таким же чином, можуть позначатися їх загальноприйнятими однопітерними кодами. Вищезгадані терміни більш повно визначені з посиланням на даний опис у цілому.

Як застосовується в даному документі, "нуклеїнова кислота" включає посилання на дезоксирибонуклеотидний або рибонуклеотидний полімер або в одно-, або в двонитковій формі, та, якщо термін не обмежений іншим чином, охоплює відомі аналоги (наприклад, пептидо-нуклеїнові кислоти), що мають основні властивості природних нуклеотидів, які полягають у тому, що вони гібридизуються з однопітерними нуклеїновими кислотами подібно до нуклеотидів, що зустрічаються в природних умовах.

Як застосовується в даному документі, терміни "що кодує" або "що кодується", якщо вони застосовуються в контексті певної нуклеїнової кислоти, означають, що нуклеїнова кислота містить необхідну інформацію для керування трансляцією нуклеотидної послідовності з одержанням певного білка. Інформація, якою кодується білок, визначається застосуванням кодонів. Нуклеїнова кислота, що кодує білок, може містити нетрансльовані послідовності (наприклад, інтрони) в межах трансльованих ділянок нуклеїнової кислоти або може не містити таких нетрансльованих послідовностей, що лежать між ними (наприклад, як у кДНК).

Використовувана у даному документі фраза "послідовність повної довжини" щодо певного

полінуклеотиду або білка, що кодується ним, означає присутність повної послідовності нуклеїнової кислоти або повної амінокислотної послідовності нативної (несинтетичної) ендогенної послідовності. Полінуклеотид повної довжини кодує повнорозмірну каталітично активну форму певного білка.

5 Застосований у даному документі термін "антисенсова" при використанні в контексті орієнтації нуклеотидної послідовності відноситься до дуплексної послідовності полінуклеотиду, яка функціонально пов'язана з промотором в орієнтації, за якої транскрибується антисенсова нитка. Антисенсова нитка значною мірою комплементарна ендогенному продукту транскрипції, так що трансляція ендогенного продукту транскрипції часто пригнічується. Таким чином, у
10 випадках, коли термін "антисенсова" використовується в контексті конкретної нуклеотидної послідовності, термін відноситься до комплементарної нитки еталонного продукту транскрипції.

Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" використовуються у даному документі взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Терміни використовують
15 собою амінокислотних полімерів, у яких один або декілька амінокислотних залишків являють собою штучний хімічний аналог відповідної амінокислоти, що зустрічається у природних умовах, а також щодо амінокислотних полімерів, що зустрічаються у природних умовах.

Терміни "залишок", або "амінокислотний залишок", або "амінокислота" застосовуються у даному документі взаємозамінно та належать до амінокислоти, яка вбудована в білок, поліпептид або пептид (у збірному значенні "білок"). Амінокислота може являти собою
20 амінокислоту, що зустрічається в природних умовах, та, якщо не обмежується іншим чином, вона може охоплювати відомі аналоги природних амінокислот, які можуть функціонувати подібно до амінокислот, що зустрічаються в природних умовах.

Поліпептиди згідно з варіантами здійснення можна одержати або з нуклеїнової кислоти, розкритої у даному документі, або за допомогою застосування стандартних методик
25 молекулярної біології. Наприклад, білок згідно з варіантами здійснення можна одержати шляхом експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з варіантами здійснення у відповідній клітині-хазяїні або, як альтернатива, за допомогою комбінації процедур *ex vivo*.

Використовувані у даному документі терміни "виділений" та "очищений" використовуються взаємозамінно та відносяться до нуклеїнових кислот, або поліпептидів, або їх біологічно
30 активних частин, які практично або по суті не містять компонентів, що в нормі супроводжують нуклеїнову кислоту або поліпептид або взаємодіють з ними, коли вони знаходяться у їх природному оточенні. Таким чином, виділені або очищені нуклеїнова кислота або поліпептид практично не містять інший клітинний матеріал або культуральне середовище при одержанні за допомогою рекомбінантних методик або практично не містять хімічних попередників або інших
35 хімічних продуктів, якщо вони синтезовані хімічним способом.

"Виділена" нуклеїнова кислота звичайно не містить послідовностей (таких як, наприклад, послідовності, що кодують білок), які в природних умовах фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5'- та 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму,
40 з якого одержана нуклеїнова кислота. Наприклад, у різних варіантах здійснення виділені нуклеїнові кислоти можуть містити менше ніж приблизно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. або 0,1 т.о. нуклеотидних послідовностей, які в природних умовах фланкують нуклеїнові кислоти в геномній ДНК клітини, з якої одержана нуклеїнова кислота.

Використовувані в даному документі терміни "виділений" або "очищений", у випадку, коли вони використовуються щодо поліпептиду згідно з варіантами здійснення, означають, що
45 виділений білок практично не містить клітинний матеріал та включає препарати білка, що містять менше ніж приблизно 30%, 20%, 10% або 5% (за сухою вагою) забруднюючого білка. Якщо білок згідно з варіантами здійснення або його біологічно активна частина одержані за допомогою методик рекомбінантних ДНК, то культуральне середовище містить менше ніж приблизно 30%, 20%, 10% або 5% (за сухою вагою) хімічних попередників або хімічних
50 продуктів, які не є білком, що становить інтерес.

"Рекомбінантна" молекула нуклеїнової кислоти (або ДНК) застосовується у даному документі для позначення послідовності нуклеїнової кислоти (або ДНК), яка знаходиться у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення
55 "виділена" або "рекомбінантна" нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно, послідовностей, що кодують білок), які в природних умовах фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5'- та 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) в геномній ДНК організму, з якого одержана нуклеїнова кислота. У контексті даного розкриття терміни "виділені" або "рекомбінантні" при застосуванні для позначення молекул нуклеїнової кислоти виключають виділені хромосоми.

60 Застосовувані у даному документі "послідовність нуклеїнової кислоти, що відрізняється від

геномної" або "молекула нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геномної" відносяться до молекули нуклеїнової кислоти, яка має одну або декілька змін в послідовності нуклеїнової кислоти порівняно з нативною або геомною послідовністю нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах здійснення зміна щодо нативної або геомної молекули нуклеїнової кислоти включає без обмеження зміни в послідовності нуклеїнової кислоти, обумовлені виродженістю генетичного коду; оптимізацію кодонів послідовності нуклеїнової кислоти для експресії в рослинах; зміни в послідовності нуклеїнової кислоти для введення щонайменше однієї амінокислотної заміни, вставки, делеції та/або додавання порівняно з нативною або геомною послідовністю; видалення одного або декількох інтронів, асоційованих з геомною послідовністю нуклеїнової кислоти; вставку одного або декількох гетерологічних інтронів; делецію однієї або декількох регуляторних ділянок, розташованих вище або нижче, асоційованих з геомною послідовністю нуклеїнової кислоти; вставку однієї або декількох гетерологічних регуляторних ділянок, розташованих вище або нижче; делецію 5'- та/або 3'-нетрансльованої ділянки, асоційованої з геомною послідовністю нуклеїнової кислоти; вставку гетерологічної 5'- та/або 3'-нетрансльованої ділянки та модифікацію сайту поліаденілювання. У деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геомної, являє собою кДНК. У деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геомної, являє собою синтетичну послідовність нуклеїнової кислоти.

Буде зрозуміло, що у всій заявці вираз "що містить" або варіанти, такі як "містить" або "який містить", передбачає включення наведеного елемента, цілого числа, або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, а не виключення будь-якого іншого елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій.

Використовуваний у даному документі термін "вплив на комах-шкідників" відноситься до здійснення змін щодо живлення, росту та/або поведінки комах на будь-якій стадії розвитку, у тому числі без обмеження до знищення комах; затримки росту; запобігання виникненню здатності до репродукції; антифідантної активності тощо.

Використовувані у даному документі терміни "пестицидна активність" та "інсектицидна активність" використовуються як синоніми та відносяться до активності організму або речовини (такої як, наприклад, білок), яку можна виміряти без обмеження за смертністю шкідника, втратою ваги шкідником, відлякуванням шкідника та іншими змінами поведінки та фізичних характеристик шкідника після живлення та впливу протягом відповідного періоду часу. Таким чином, організм або речовина з пестицидною активністю здійснює негативний вплив щонайменше на один вимірюваний параметр пристосованості шкідника. Наприклад, "пестицидні білки" являють собою білки, які проявляють пестицидну активність окремо або в комбінації з іншими білками.

Використовуваний у даному документі термін "пестицидно ефективна кількість" означає кількість речовини або організму, що має пестицидну активність, коли присутня у середовищі існування шкідника. Для кожної речовини або організму пестицидно ефективну кількість визначають емпірично щодо кожного шкідника, на якого здійснюється вплив у конкретному середовищі. Аналогічно, "інсектицидно ефективна кількість" може бути використана для позначення "пестицидно ефективної кількості", якщо шкідник являє собою шкідника-комаху.

Використовувані у даному документі терміни "рекомбінантно сконструйований" або "сконструйований" означають використання технології рекомбінантної ДНК для внесення (наприклад, при конструюванні) зміни в структуру білка, виходячи з розуміння механізму дії білка та аналізу амінокислот, які вводять, видаляють або заміняють.

Використовувані в даному документі терміни "мутантна нуклеотидна послідовність", або "мутація", або "нуклеотидна послідовність, щодо якої здійснювали мутагенез" означають нуклеотидну послідовність, піддану мутагенезу або змінену таким чином, щоб вона містила один або декілька нуклеотидних залишків (наприклад, пару основ), які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або зміна полягає в одному або декількох додаваннях, делеціях, або замінах, або заміщеннях залишків нуклеїнової кислоти. Якщо мутації створені шляхом додавання, видалення або заміщення амінокислоти у сайті протеолітичного розщеплення, такі додавання, видалення або заміщення можуть здійснюватись у межах мотиву протеолітичного сайту або прилягати до нього за умови досягнення мети мутації (тобто за умови зміненого протеолізу за даним сайтом).

Мутантна нуклеотидна послідовність може кодувати мутантний інсектицидний токсин, що проявляє поліпшену або знижену інсектицидну активність, або амінокислотну послідовність, що надає поліпшеної або зниженої інсектицидної активності поліпептиду, який її містить. Використовувані у даному документі терміни "мутант" або "мутація" в контексті білка, поліпептидної або амінокислотної послідовності відносяться до послідовності, яку піддавали

мутагенезу або яку змінювали таким чином, щоб вона містила один або декілька амінокислотних залишків, які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або зміна полягає в одному або декількох додаваннях, делеціях, або замінах, або заміщеннях амінокислотних залишків. Мутантний поліпептид проявляє поліпшену або знижену інсектицидну активність або являє собою амінокислотну послідовність, що надає поліпшеній інсектицидної активності поліпептиду, який її містить. Таким чином, терміни "мутант" або "мутація" відносяться до будь-чого з мутантної нуклеотидної послідовності та амінокислот, що кодуються ними, або до них обох. Мутантів можна використовувати окремо або у будь-якій сумісній комбінації з іншими мутантами згідно з варіантами здійснення або з іншими мутантами. "Мутантний поліпептид", навпаки, може проявляти зниження інсектицидної активності. У випадку, коли більше ніж одну мутацію додають до конкретної нуклеїнової кислоти або білка, мутації можуть бути додані одночасно або послідовно; якщо послідовно, мутації можуть бути додані у будь-якому придатному порядку.

Використовувани у даному документі терміни "поліпшена інсектицидна активність" або "поліпшена пестицидна активність" відносяться до інсектицидного поліпептиду згідно з варіантами здійснення, який має посилену інсектицидну активність порівняно з активністю відповідного йому білка дикого типу, та/або до інсектицидного поліпептиду, ефективного проти більш широкого спектра комах, та/або до інсектицидного поліпептиду, який характеризується специфічністю щодо комахи, не чутливої до токсичності білка дикого типу. Для висновку про поліпшену або посилену пестицидну активність потрібна демонстрація підвищення пестицидної активності щонайменше на 10% щодо комахи-мішені або підвищення пестицидної активності щонайменше на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 100%, 150%, 200%, або 300%, або більше порівняно з пестицидною активністю інсектицидного поліпептиду дикого типу, визначеною щодо такої ж комахи.

Наприклад, поліпшена пестицидна або інсектицидна активність забезпечується у тих випадках, коли поліпептид здійснює вплив на більш широкий або більш вузький спектр комах порівняно зі спектром комах, на які впливає токсин Bt дикого типу. Більш широкий спектр впливу може бути бажаним у тих випадках, коли необхідна універсальність, тоді як більш вузький спектр впливу може бути бажаним у тих випадках, коли, наприклад, за інших обставин може здійснюватися вплив на корисних комах при застосуванні або у присутності токсину. Хоча варіанти здійснення не пов'язані з будь-яким конкретним механізмом дії, поліпшену пестицидну активність також можна забезпечити за допомогою змін однієї або декількох характеристик поліпептиду; наприклад, стабільність або тривалість існування поліпептиду у кишечнику комахи може бути збільшеною порівняно зі стабільністю або тривалістю існування відповідного білка дикого типу.

Використовуваний у даному документі термін "токсин" відноситься до поліпептиду, що проявляє пестицидну активність, або інсектицидну активність, або поліпшену пестицидну активність, або поліпшену інсектицидну активність. Токсин "Bt" або "*Bacillus thuringiensis*", як передбачається, включає більш широкий клас Cry-токсинів, що виявляються у різних штаммах Bt, який включає такі токсини, як, наприклад, Cry1s, Cry2s або Cry3s.

Терміни "сайт протеолітичного розщеплення" або "сайт розщеплення" відносяться до амінокислотної послідовності, що надає чутливості до класу протеаз або конкретної протеази таким чином, що поліпептид, який містить цю амінокислотну послідовність, розщеплюється класом протеаз або конкретною протеазою. Сайт протеолітичного розщеплення вважається "чутливим" до протеази(протеаз), яка(які) розпізнає(розпізнають) цей сайт. З рівня техніки відомо, що ефективність розщеплення буде варіювати та що зниження ефективності розщеплення може привести до підвищення стабільності або тривалості існування поліпептиду у кишечнику комахи. Таким чином, протеолітичний сайт може надавати чутливості до більш ніж однієї протеази або класу протеаз, але ефективність розщеплення за цим сайтом може варіювати для різних протеаз. Сайти протеолітичного розщеплення включають, наприклад, сайти для трипсину, сайти для хімотрипсину та сайти для еластази.

Дослідження показало, що протеази кишечника комахи, що відноситься до лускокрилих, включають трипсини, хімотрипсини та еластази. Див., наприклад, Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212 та Hedegus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47. Наприклад, приблизно 18 різних трипсинів було виявлено у середній кишці личинки *Helicoverpa armigera* (див. Gatehouse et al. (1997) Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 929-944). Були виявлені переважні сайти-субстрати протеолітичного розщеплення для цих протеаз. Див., наприклад, Peterson et al. (1995) Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 765-774.

Здійснювались спроби зрозуміти механізм дії Bt-токсинів та сконструювати токсини з поліпшеними властивостями. Було показано, що протеази кишечника комахи можуть впливати

на дію Cry-білків Bt, спрямовану на комаху. Деякі протеази активують Cry-білки за допомогою їх процесингу з форми "протоксину" у токсичну форму або "токсин." Див. Oppert (1999) Arch. Insect Biochem. Phys. 42: 1-12 та Carroll et al. (1997) J. Invertebrate Pathology 70: 41-49. Ця активація токсину може включати видалення N- та C-кінцевих пептидів з білка, а також може включати внутрішнє розщеплення білка. Інші протеази можуть розкласти Cry-білки. Див. Oppert, також там.

Порівняння амінокислотних послідовностей Cry-токсинів із різною специфічністю виявило п'ять висококонсервативних блоків послідовностей. Що стосується структури, токсини містять три окремих домени, які являють собою, від N- до C-кінця: кластер із семи альфа-спіралей, який бере участь в утворенні пори (що називається "доменом 1"), три антипаралельних бета-листи, які беруть участь у зв'язуванні з клітиною (що називається "доменом 2"), та бета-сендвіч (що називається "доменом 3"). Розташування та властивості цих доменів відомі спеціалісту в даній галузі техніки. Див., наприклад, Li et al. (1991) Nature, 305:815-821 та Morse et al. (2001) Structure, 9:409-417. Якщо згадується конкретний домен, такий як домен 1, слід розуміти, що точні кінцеві характеристики домену стосовно конкретної послідовності не є вирішальними за умови, що послідовність або її частина включає послідовність, яка забезпечує щонайменше будь-яку функцію, що приписується конкретному домену. Таким чином, наприклад, при згадуванні "домену 1" передбачається, що конкретна послідовність включає кластер із семи альфа-спіралей, але точні кінцеві показники послідовності, яка використовується або згадується стосовно даного кластеру, не є вирішальними. Спеціаліст у даній галузі техніки обізнаний у визначенні таких кінцевих характеристик та оцінці таких функцій. Для того щоб краще охарактеризувати та поліпшити Bt-токсини, досліджували штами бактерії Bt. Були виявлено, що препарати кристалів, одержані з культур штамів Bt, мають пестицидну активність щодо численних лускокрилих шкідників (див., наприклад, експериментальний приклад 1). Здійснювали спробу ідентифікувати нуклеотидні послідовності, які кодуєть білки кристалів з вибраних штамів, та при цьому нуклеїнові кислоти дикого типу (тобто такі, що зустрічаються в природних умовах) згідно з варіантами здійснення виділяли з цих штамів бактерій, клонували у вектор експресії та трансформували в *E. coli*. Залежно від характеристик даного препарату вважається, що для демонстрації пестицидної активності іноді потрібна попередня обробка трипсином для активації пестицидних білків. Таким чином, зрозуміло, що для деяких пестицидних білків для активації потрібне розщеплення протеазою (наприклад, трипсином, хімотрипсином тощо), тоді як інші білки є біологічно активними (наприклад, пестицидними) за відсутності активації.

Такі молекули можна змінювати за допомогою засобів, описаних, наприклад, у патенті США № 7462760. Крім того, послідовності нуклеїнової кислоти можна сконструювати таким чином, щоб вони кодували поліпептиди, які містять додаткові мутації, що надають поліпшеної або зміненої пестицидної активності порівняно з пестицидною активністю поліпептиду, що зустрічається в природних умовах. Нуклеотидні послідовності таких сконструйованих нуклеїнових кислот містять мутації, які не виявляються в послідовностях дикого типу.

Мутантні поліпептиди згідно з варіантами здійснення звичайно одержують за допомогою способу, який включає стадії одержання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид родини Cry; аналізу структури поліпептиду для ідентифікації певних сайтів-"мішеней" для мутагенезу генної послідовності, що лежить в основі, виходячи з уявлень про ймовірну функцію домену-мішені та механізму дії токсину; введення однієї або декількох мутацій у послідовність нуклеїнової кислоти з одержанням необхідної зміни в одному або декількох амінокислотних залишках поліпептидної послідовності та аналізу одержаного поліпептиду щодо пестицидної активності.

Багато інсектицидних Bt-токсинів є спорідненими з різними ступенями схожості їхніх амінокислотних послідовностей та третинної структури, та при цьому засоби для одержання кристалічних структур Bt-токсинів є добре відомими. Ілюстративні результати розрахунку кристалічної структури з високою роздільною здатністю для поліпептидів як Cry3A, так і Cry3B доступні в літературі. Розрахована структура гена Cry3A (Li et al. (1991) Nature 353:815-821) забезпечує розуміння взаємозв'язку між структурою та функцією токсину. Спільний розгляд опублікованих структурних аналізів Bt-токсинів та описаної функції, пов'язаної з конкретними структурами, мотивами тощо, вказує на те, що специфічні ділянки токсину співвідносяться з конкретними функціями та окремими стадіями механізму дії білка. Наприклад, багато токсинів, виділених з Bt, зазвичай описують як такі, що містять три домени: пучок із семи спіралей, який бере участь в утворенні пори, домен з трьох листів, який бере участь у зв'язуванні з рецептором, та бета-сендвіч мотив (Li et al. (1991) Nature 305: 815-821).

Як описано в патентах США № 7105332 та № 7462760, токсичність Cry-білків можна

поліпшити шляхом цілеспрямованого впливу на ділянку, розташовану між альфа-спіралями 3 та 4 у домені 1 токсину. Ця теорія базується на сукупності знань, що стосуються інсектицидних токсинів, у тому числі: 1) про те, що альфа-спіралі 4 та 5 у домені 1 Cry3A-токсинів, як повідомлялося, вбудовуються у ліпідний бішар клітин, що вистилають середню кишку чутливих комах (Gazit et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12289-12294); 2) на знаннях авторів даного винаходу про розташування сайтів розщеплення трипсином та хімотрипсином в амінокислотній послідовності білка дикого типу; 3) на спостереженні, що білок дикого типу був більш активним щодо певних комах після активації *in vitro* при обробці трипсином або хімотрипсином; та 4) на повідомленнях про те, що розщеплення токсинів з 3'-кінця призводило в результаті до зниженої токсичності щодо комах.

Для створення нових поліпептидів із посиленою або зміненою пестицидною активністю можна створити ряд мутацій та помістити у різні фонові послідовності. Див., наприклад, патент США № 7462760. Ці мутанти включають без обмеження додавання щонайменше одного додаткового чутливого до протеази сайту (наприклад, сайту розщеплення для трипсину) в ділянку, розташовану між спіралями 3 та 4 у домені 1; заміщення вихідного чутливого до протеази сайту в послідовності дикого типу відмінним чутливим до протеази сайтом; додавання декількох чутливих до протеази сайтів у конкретному положенні; додавання амінокислотних залишків близько до чутливого до протеази сайту(сайтів) для зміни фолдингу поліпептиду та, таким чином, посилення розщеплення поліпептиду у чутливому до протеази сайті(сайтах); та додавання мутацій для захисту поліпептиду від руйнуючого розщеплення, яке знижує токсичність (наприклад, створення ряду мутацій, за яких амінокислота дикого типу замінюється на валін для захисту поліпептиду від розщеплення). Мутації можна використовувати окремо або в будь-якій комбінації для забезпечення поліпептидів згідно з варіантами здійснення.

Гомологічні послідовності ідентифікували за допомогою пошуку подібності в ненадлишковій (біля) базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) із застосуванням BLAST та PSI-BLAST. Гомологічні білки склалися з Cry-токсинів переважно з *Bacillus thuringiensis*.

Мутація, яка являє собою додатковий або альтернативний чутливий до протеази сайт, може бути чутливою до декількох класів протеаз, таких як серинові протеази, які включають трипсин та хімотрипсин, або ферментів, таких як еластаза. Таким чином, мутацію, яка являє собою додатковий або альтернативний чутливий до протеази сайт, можна сконструювати для того, щоб сайт легко розпізнавався та/або розщеплювався категорією протеаз, таких як протеази ссавців або протеази комах. Чутливий до протеази сайт також можна сконструювати таким чином, щоб він розщеплювався конкретним класом ферментів або конкретним ферментом, про який відомо, що він продукується в організмі, таким як, наприклад, хімотрипсином, що продукується бавовняною совкою *Heliothis zea* (Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212). Мутації також можуть надавати стійкість до протеолітичного розщеплення, наприклад, до розщеплення хімотрипсином за С-кінцем пептиду.

Присутність додаткового та/або альтернативного чутливого до протеази сайту в амінокислотній послідовності поліпептиду, що кодується, може поліпшити пестицидну активність та/або специфічність поліпептиду, що кодується нуклеїновими кислотами згідно з варіантами здійснення. Відповідно, нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення можуть бути рекомбінантно сконструйованими або з ними можуть бути здійснені маніпуляції для одержання поліпептидів із поліпшеною або зміненою інсектицидною активністю та/або специфічністю порівняно з такими у немодифікованого токсину дикого типу. Крім того, мутації, розкриті у даному документі, можна помістити в інші нуклеотидні послідовності або застосовувати у комбінації з ними для забезпечення поліпшених властивостей. Наприклад, чутливий до протеази сайт, який легко розщеплюється хімотрипсином комахи, наприклад хімотрипсином, що виявляється у совки Берта або бавовняної совки (Hegedus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47 та Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212), можна помістити у фонову послідовність Cry для забезпечення поліпшеної токсичності у цієї послідовності. Таким чином, варіанти здійснення передбачають токсичні поліпептиди з поліпшеними властивостями.

Наприклад, піддана мутагенезу нуклеотидна послідовність Cry може передбачати додаткові мутанти, що містять додаткові кодони, які вводять другу чутливу до трипсину амінокислотну послідовність (додатково до сайту для трипсину, що зустрічається в природних умовах) у поліпептид, що кодується. Альтернативний додатковий мутант згідно з варіантами здійснення передбачає додаткові кодони, сконструйовані для введення щонайменше одного додаткового відмінного чутливого до протеази сайту в поліпептид, наприклад, чутливого до хімотрипсину сайту, розташованого безпосередньо у напрямку 5' або 3' від сайту для трипсину, що

зустрічається в природних умовах. Альтернативно, можна створити мутантів із заміною, у яких щонайменше один кодон нуклеїнової кислоти, який кодує чутливий до протеази сайт, що зустрічається в природних умовах, зруйнований, а альтернативні кодони введені у послідовність нуклеїнової кислоти з метою забезпечення відмінного (наприклад, заміненого) чутливого до протеази сайту. Мутант із заміщенням також може бути доданий до послідовності C_{ry}, у якій присутній у поліпептиді, що кодується, сайт розщеплення для трипсину, який зустрічається в природних умовах, зруйнований, а сайт розщеплення для хімотрипсину або еластази введений на його місце.

Вважається, що можна застосовувати будь-яку нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотні послідовності, які являють собою сайти протеолітичного розщеплення або передбачувані сайти протеолітичного розщеплення (наприклад, послідовності, такі як RR або LKM), та що точна ідентичність кодонів, використовуваних для введення будь-якого з цих сайтів розщеплення у варіантний поліпептид, може варіювати залежно від застосування, тобто експресії у конкретному виді рослин. Також вважається, що будь-яку з розкритих мутацій можна ввести в будь-яку послідовність полінуклеотиду згідно з варіантами здійснення, яка містить кодони для амінокислотних залишків, що забезпечують нативний сайт розщеплення для трипсину, на який цілеспрямовано впливає модифікація. Відповідно, варіанти або токсинів повної довжини, або їхніх фрагментів можна модифікувати таким чином, щоб вони містили додаткові або альтернативні сайти розщеплення, та при цьому передбачається, що ці варіанти здійснення охоплюються обсягом варіантів здійснення, розкритих у даному документі.

Спеціаліст у даній галузі техніки зрозуміє, що будь-яку корисну мутацію можна додати до послідовностей згідно з варіантами здійснення за умови, що поліпептиди, що кодуються, зберігають пестицидну активність. Таким чином, щодо послідовностей також можна здійснювати мутагенез так, щоб поліпептиди, що кодуються, були стійкими до протеолітичного розщеплення хімотрипсином. Більше ніж один сайт розпізнавання можна додати у конкретному положенні в будь-якій комбінації, та при цьому декілька сайтів розпізнавання можна додати до токсину або видалити з нього. Таким чином, додаткові мутації можуть містити три, чотири або більше сайтів розпізнавання. Слід розуміти, що декілька мутацій можна сконструювати у будь-якій придатній послідовності полінуклеотиду; відповідно, або послідовності повної довжини, або їхні фрагменти можна модифікувати таким чином, щоб вони містили додаткові або альтернативні сайти розщеплення, а також були стійкими до протеолітичного розщеплення. Таким чином, варіанти здійснення передбачають C_{ry}-токсини, що містять мутації, які поліпшують пестицидну активність, а також поліпшені композиції та способи здійснення впливу на шкідників із використанням інших Bt-токсинів.

Мутації можуть захищати поліпептид від руйнування протеазою, наприклад, шляхом видалення передбачуваних сайтів протеолітичного розщеплення, таких як передбачувані сайти для серинової протеази та сайти розпізнавання для еластази, з різних ділянок. Деякі або всі такі передбачувані сайти можна видалити або змінити так, щоб знизити протеоліз у місці розташування вихідного сайту. Зміни протеолізу можна оцінити шляхом порівняння мутантного поліпептиду з токсинами дикого типу або шляхом порівняння мутантних токсинів, які відрізняються за їхньою амінокислотною послідовністю. Передбачувані сайти протеолітичного розщеплення та сайти протеолітичного розщеплення включають без обмеження наступні послідовності: RR, сайт розщеплення для трипсину; LKM, сайт для хімотрипсину; та сайт для трипсину. Ці сайти можна змінити шляхом додавання або видалення будь-якого числа та виду амінокислотних залишків за умови, що пестицидна активність поліпептиду підвищується. Таким чином, поліпептиди, що кодуються нуклеотидними послідовностями, які містять мутації, будуть передбачати щонайменше одну зміну або додавання амінокислоти порівняно з нативною або фоновою послідовністю або 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 38, 40, 45, 47, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 або 280 або більше змін або додавань амінокислоти. Пестицидну активність поліпептиду також можна поліпшити шляхом усічення нативної послідовності або послідовності повної довжини, як відомо з рівня техніки.

Композиції згідно з варіантами здійснення включають нуклеїнові кислоти, а також їхні фрагменти та варіанти, які кодують пестицидні поліпептиди. Зокрема, варіанти здійснення передбачають виділені молекули нуклеїнової кислоти, які містять нуклеотидні послідовності, які кодують амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10, або нуклеотидні послідовності, які кодують указану амінокислотну послідовність, наприклад нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, а також їхні фрагменти та варіанти.

Інтерес також становлять оптимізовані нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні

білки згідно з варіантами здійснення. Використовувана у даному документі фраза "оптимізовані нуклеотидні послідовності" відноситься до нуклеїнових кислот, які є оптимізованими для експресії в конкретному організмі, наприклад рослині. Оптимізовані нуклеотидні послідовності можна одержати для будь-якого організму, що становить інтерес, за допомогою способів, відомих із рівня техніки. Див., наприклад, патент США № 7462760, у якому описана оптимізована нуклеотидна послідовність, що кодує розкритий пестицидний білок. У даному прикладі нуклеотидну послідовність одержували за допомогою "зворотної трансляції" амінокислотної послідовності білка та зміни нуклеотидної послідовності, так щоб вона містила переважні для маїсу кодони та при цьому все ще кодувала таку ж саму амінокислотну послідовність. Ця процедура детальніше описана у Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498. Оптимізовані нуклеотидні послідовності знаходять застосування при підвищенні експресії пестицидного білка у рослині, наприклад, в однодольних рослинах родини Gramineae (Poaceae), таких як, наприклад, рослина маїсу або кукурудзи.

Варіанти здійснення додатково передбачають виділені пестицидні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди, що кодуються або нуклеїновою кислотою згідно з варіантами здійснення. Більш конкретно варіанти здійснення передбачають поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10, що кодується нуклеїновими кислотами, описаними в даному документі, наприклад, викладеними в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, а також їхні фрагменти та варіанти.

У деяких варіантах здійснення передбачаються поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10, а також їхні фрагменти та варіанти.

У конкретних варіантах здійснення пестицидні білки згідно з варіантами здійснення передбачають інсектицидні поліпептиди повної довжини, фрагменти інсектицидних поліпептидів повної довжини та варіантні поліпептиди, що одержані з підданих мутагенезу нуклеїнових кислот, сконструйованих для введення конкретних амінокислотних послідовностей у поліпептиди згідно з варіантами здійснення. У конкретних варіантах здійснення амінокислотні послідовності, які вводять у поліпептиди, містять послідовність, яка забезпечує сайт розщеплення для ферменту, такого як протеаза.

З рівня техніки відомо, що пестицидна активність Bt-токсинів, як правило, активується при розщепленні пептиду в кишечнику комахи різними протеазами. Оскільки пептиди не завжди можуть розщеплюватися у кишечнику комахи з повною ефективністю, фрагменти токсину повної довжини можуть характеризуватися посиленою пестицидною активністю порівняно із самим токсином повної довжини. Таким чином, деякі з поліпептидів згідно з варіантами здійснення включають фрагменти інсектицидного поліпептиду повної довжини, та деякі з фрагментів, варіантів та мутацій поліпептиду будуть характеризуватися посиленою пестицидною активністю порівняно з активністю інсектицидного поліпептиду, що зустрічається в природних умовах, з якого вони одержані, особливо, якщо інсектицидний поліпептид, що зустрічається в природних умовах, не активується *in vitro* протеазою перед скринінгом щодо активності. Таким чином, даною заявкою охоплюються усічені варіанти або фрагменти послідовностей.

Мутації можна помістити в будь-яку фонову послідовність, у тому числі в такі усічені поліпептиди за умови, що поліпептид зберігає пестицидну активність. Фахівець у даній галузі техніки може легко порівняти два або більше білків щодо пестицидної активності за допомогою аналізів, відомих із рівня техніки або описаних в інших місцях у даному документі. Слід розуміти, що поліпептиди згідно з варіантами здійснення можна одержати або шляхом експресії нуклеїнової кислоти, розкритої у даному документі, або шляхом застосування стандартних методик молекулярної біології.

Вважається, що пестицидні білки можуть бути олігомерними та будуть відрізнятися за молекулярною масою, числом залишків, складовими пептидами, активністю щодо певних шкідників та іншими характеристиками. Проте за допомогою способів, викладених у даному документі, можна виділити та охарактеризувати білки, активні щодо ряду шкідників. Пестицидні білки згідно з варіантами здійснення можна застосовувати в комбінації з іншими Bt-токсинами або іншими інсектицидними білками для розширення спектра комах-мішеней. До того ж застосування пестицидних білків згідно з варіантами здійснення в комбінації з іншими Bt-токсинами або іншими інсектицидними активними компонентами відмінної природи є особливо корисним для запобігання та/або стримування розвитку стійкості у комах. Інші інсектицидні засоби включають інгібітори протеаз (як серинового, так і цистеїнового типів), α -амілази та пероксидази.

Фрагменти та варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей та поліпептидів, що кодуються ними, також охоплюються варіантами здійснення. Використовуваний у даному документі термін "фрагмент" відноситься до частини нуклеотидної послідовності полінуклеотиду або до частини амінокислотної послідовності поліпептиду згідно з варіантами здійснення.

5 Фрагменти нуклеотидної послідовності можуть кодувати фрагменти білка, які зберігають біологічну активність нативного білка або відповідного білка повної довжини та, отже, мають пестицидну активність. Таким чином, вважається, що деякі з послідовностей полінуклеотидів та амінокислотних послідовностей згідно з варіантами здійснення можна справедливо називати як фрагментами, так і мутантами.

10 Слід розуміти, що термін "фрагмент" у тому значенні, у якому він використовується щодо послідовностей нуклеїнової кислоти згідно з варіантами здійснення, також охоплює послідовності, що є застосовними як гібридизаційні зонди. Нуклеотидні послідовності з цього класу зазвичай не кодують фрагменти білків, що зберігають біологічну активність. Таким чином, фрагменти нуклеотидної послідовності можуть варіювати в діапазоні від щонайменше

15 приблизно 20 нуклеотидів, приблизно 50 нуклеотидів, приблизно 100 нуклеотидів та до нуклеотидної послідовності повної довжини, що кодує білки згідно з варіантами здійснення.

Фрагмент нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення, який кодує біологічно активну частину пестицидного білка згідно з варіантами здійснення, буде кодувати щонайменше

20 15, 25, 30, 50, 100, 200, 250 або 300 суміжних амінокислот або до загального числа амінокислот, що присутні у пестицидному поліпептиді згідно з варіантами здійснення (наприклад, 751 амінокислот для SEQ ID NO: 2). Таким чином, слід розуміти, що варіантами здійснення також охоплюються поліпептиди, які являють собою фрагменти ілюстративних пестицидних білків згідно з варіантами здійснення та мають довжину щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 200, 250 або

25 300 суміжних амінокислот або до загального числа амінокислот, що присутні у пестицидному поліпептиді згідно з варіантами здійснення (наприклад, 751 амінокислот для SEQ ID NO: 2). Для фрагментів нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення, що є застосовними як гібридизаційні зонди або ПЛР-праймери, звичайно не потрібно, щоб вони кодували біологічно активну частину пестицидного білка. Таким чином, фрагмент нуклеїнової кислоти згідно з

30 варіантами здійснення може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або він може являти собою фрагмент, який можна застосовувати як гібридизаційний зонд або ПЛР-праймер із застосуванням способів, розкритих у даному документі. Біологічно активну частину пестицидного білка можна одержати шляхом виділення частини однієї з нуклеотидних послідовностей згідно з варіантами здійснення, експресії частини пестицидного білка, що кодується (наприклад, шляхом рекомбінантної експресії *in vitro*), та оцінки активності частини

35 пестицидного білка, що кодується.

Нуклеїнові кислоти, які являють собою фрагменти нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення, містять щонайменше 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 850, 900 або 950 нуклеотидів або до числа нуклеотидів, що присутні у нуклеотидній послідовності, розкритій у даному документі (наприклад, 2256 нуклеотидів для

40 SEQ ID NO: 1). Конкретні варіанти здійснення передбачають фрагменти, що походять із (наприклад, одержані з) першої нуклеїнової кислоти згідно з варіантами здійснення, де фрагмент кодує усічений токсин, що має пестицидну активність. Усічені поліпептиди, що кодуються полінуклеотидними фрагментами згідно з варіантами здійснення, мають пестицидну активність, яка є або еквівалентною, або поліпшеною порівняно з активністю відповідного

45 поліпептиду повної довжини, що кодується першою нуклеїновою кислотою, з якої походить фрагмент. Передбачається, що такі фрагменти нуклеїнової кислоти згідно з варіантами здійснення можуть бути усіченими за 3'-кінцем нативної кодувальної послідовності або відповідної кодувальної послідовності повної довжини. Фрагменти нуклеїнової кислоти також можуть бути усіченими як за 5'-, так і за 3'-кінцем нативної кодувальної послідовності або

50 відповідної кодувальної послідовності повної довжини.

Термін "варіанти" використовується у даному документі для позначення значною мірою схожих послідовностей. Для нуклеотидних послідовностей консервативні варіанти включають ті послідовності, які через виродженість генетичного коду кодують амінокислотну послідовність

55 одного з пестицидних поліпептидів згідно з варіантами здійснення. Спеціалісти в даній галузі техніки легко розуміють, що внаслідок виродженості генетичного коду існує багато нуклеотидних послідовностей, що кодують білки згідно з даним винаходом. Таблиця 1 являє собою таблицю кодонів, у якій представлені синонімічні кодони для кожної амінокислоти. Наприклад, усі кодони AGA, AGG, CGA, CGC, CGG та CGU кодують амінокислоту аргінін. Таким

60 чином, у кожному положенні в нуклеїнових кислотах згідно з даним винаходом, у якому аргінін позначений кодоном, кодон може бути змінений на будь-який із відповідних кодонів, описаних

вище, без зміни поліпептиду, що кодується. Зрозуміло, що U в послідовності РНК відповідає Т в послідовності ДНК.

Таблиця 1

Аланін	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
Цистеїн	Cys	C	UGC	UGU						
Аспарагінова кислота	Asp	D	GAC	GAU						
Глутамінова кислота	Glu	E	GAA	GAG						
Фенілаланін	Phe	F	UUC	UUU						
Гліцин	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU				
Гістидин	His	H	CAC	CAU						
Ізолейцин	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
Лізін	Lys	K	AAA	AAG						
Лейцин	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
Метіонін	Met	M	AUG							
Аспарагін	Asn	N	AAC	AAU						
Пролін	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU				
Глутамін	Gln	Q	CAA	CAG						
Аргінін	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU		
Серин	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU		
Треонін	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU				
Валін	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU				
Триптофан	Trp	W	UGG							
Тирозин	Tyr	Y	UAC	UAU						

5 За необхідності нуклеїнову кислоту можна оптимізувати для посилення експресії в організмі-хазяїні. Таким чином, якщо організм-хазяїн є рослиною, для поліпшення експресії можна синтезувати синтетичні нуклеїнові кислоти із застосуванням кодонів, переважних для рослин. Див., наприклад, Campbell and Gowri, (1990) Plant Physiol. 92:1-11 стосовно обговорення застосування кодонів, переважних для хазяїна. Наприклад, хоча послідовності нуклеїнової

10 кислоти згідно з варіантами здійснення можуть експресуватися як у видів однодольних, так і дводольних рослин, послідовності можна модифікувати з урахуванням специфічних переваг щодо кодонів та переваг за вмістом GC у однодольних або дводольних, якщо було показано, що переваги відрізняються (Murraу et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498). Таким чином, кодон, переважний для маїсу, для конкретної амінокислоти можна встановити з відомих генних послідовностей маїсу. Дані про частоту використання кодонів у маїсу для 28 генів із рослин маїсу наведені в таблиці 4 в Murraу et al., вище, 3 рівня техніки доступні способи синтезу генів, переважних для рослин. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831 та 5436391, та Murraу, et al., (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498, та Liu H et al. Mol Bio Rep 37:677-684, 2010, включені в даний документ за допомогою посилання. Таблицю використання кодонів Zea maize також

20 можна знайти на сайті kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577, доступ до якого можна одержати із застосуванням префікса www. У таблиці 2 показаний аналіз оптимальних кодонів маїсу (адаптовано з Liu H et al. Mol Bio Rep 37:677-684, 2010).

Таблиця 2

Аміно-кислота	Кодон	Висока Зустрі-чальність	RSCU	Низька Зустрі-чальність	RSCU	Аміно-кислота	Кодон	Висока Зустрі-чальність	RSCU	Низька Зустрі-чальність	RSCU
Phe	UUU	115	0,04	2301	1,22	Ala	GCU	629	0,17	3063	1,59
	UUC*	5269	1,96	1485	0,78		GCC*	8057	2,16	1136	0,59
Ser	UCU	176	0,13	2498	1,48	Tyr	GCA	369	0,1	2872	1,49
	UCC*	3489	2,48	1074	0,63		GCG*	5835	1,57	630	0,33
Leu	UCA	104	0,07	2610	1,54	Cys	UAU	71	0,04	1632	1,22
	UCG*	1975	1,4	670	0,4		UAC*	3841	1,96	1041	0,78
Leu	AGU	77	0,05	1788	1,06	His	CAU	131	0,09	1902	1,36
	AGC*	2617	1,86	1 514	0,89		CAC*	2800	1,91	897	0,64
Leu	UUA	10	0,01	1326	0,79	Gln	UGU	52	0,04	1233	1,12
	UUG	174	0,09	2306	1,37		UGC*	2291	1,96	963	0,88
	CUU	223	0,11	2396	1,43		CAA	99	0,05	2312	1,04

Таблиця 2

Аміно-кислота	Кодон	Висока Зустрічальність	RSCU	Низька Зустрічальність	RSCU	Аміно-кислота	Кодон	Висока Зустрічальність	RSCU	Низька Зустрічальність	RSCU
	CUC*	5979	3,08	1109	0,66		CAG*	3557	1,95	2130	0,96
	CUA	106	0,05	1280	0,76	Arg	CGU	153	0,12	751	0,74
	CUG*	5161	2,66	1646	0,98		CGC*	4278	3,25	466	0,46
Pro	CCU	427	0,22	1900	1,47		CGA	92	0,07	659	0,65
	CCC*	3035	1,59	601	0,47		CGG*	1793	1,36	631	0,62
	CCA	311	0,16	2140	1,66		AGA	83	0,06	1948	1,91
	CCG*	3846	2,02	513	0,4		AGG*	1493	1,14	1652	1,62
Ile	AUU	138	0,09	2388	1,3	Asn	AAU	131	0,07	3074	1,26
	AUC*	4 380	2,85	1353	0,74		AAC*	3814	1,93	1807	0,74
	AUA	88	0,06	1756	0,96	Lys	AAA	130	0,05	3215	0,98
Thr	ACU	136	0,09	1990	1,43		AAG*	5047	1,95	3340	1,02
	ACC*	3398	2,25	991	0,71	Asp	GAU	312	0,09	4217	1,38
	ACA	133	0,09	2075	1,5		GAC*	6729	1,91	1891	0,62
	ACG*	2378	1,57	495	0,36	Gly	GGU	363	0,13	2301	1,35
Val	GUU	182	0,07	2595	1,51		GGC*	7842	2,91	1282	0,75
	GUC*	4 584	1,82	1096	0,64		GGA	397	0,15	2044	1,19
	GUA	74	0,03	1325	0,77		GGG*	2186	0,81	1215	0,71
	GUG*	5257	2,08	1842	1,07	Glu	GAA	193	0,06	4080	1,1
							GAG*	6010	1,94	3307	0,9

Частоту використання кодонів порівнювали із застосуванням критерію узгодженості хі-квадрат для ідентифікації оптимальних кодонів. Кодони, які зустрічаються статистично частіше ($P < 0,01$), позначені зірочкою

Таблиця використання кодонів Glycine max показана у вигляді таблиці 3, та її також можна знайти на сайті kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847&aa=1&style=N, доступ до якого можна одержати із застосуванням префікса www.

5

Таблиця 3

TTT	F	21,2	(10493)	TCT	S	18,4	(9107)
TTC	F	21,2	(10487)	TCC	S	12,9	(6409)
TTA	L	9,2	(4545)	TCA	S	15,6	(7712)
TTG	L	22,9	(11340)	TCG	S	4,8	(2397)
CTT	L	23,9	(11829)	CCT	P	18,9	(9358)
CTC	L	17,1	(8479)	CCC	P	10,1	(5010)
CTA	L	8,5	(4216)	CCA	P	19,1	(9461)
CTG	L	12,7	(6304)	CCG	P	4,7	(2312)
ATT	I	25,1	(12411)	ACT	T	17,1	(8490)
ATC	I	16,3	(8071)	ACC	T	14,3	(7100)
ATA	I	12,9	(6386)	ACA	T	14,9	(7391)
ATG	M	22,7	(11218)	ACG	T	4,3	(2147)
GTT	V	26,1	(12911)	GCT	A	26,7	(13201)
GTC	V	11,9	(5894)	GCC	A	16,2	(8026)
GTA	V	7,7	(3803)	GCA	A	21,4	(10577)
GTG	V	21,4	(10610)	GCG	A	6,3	(3123)
TAT	Y	15,7	(7779)	TGT	C	8,1	(3995)
TAC	Y	14,9	(7367)	TGC	C	8,0	(3980)
TAA	*	0,9	(463)	TGA	*	1,0	(480)
TAG	*	0,5	(263)	TGG	W	13,0	(6412)
CAT	H	14,0	(6930)	CGT	R	6,6	(3291)
CAC	H	11,6	(5759)	CGC	R	6,2	(3093)
CAA	Q	20,5	(10162)	CGA	R	4,1	(2018)

CAG	Q	16,2	(8038)	CGG	R	3,1	(1510)
AAT	N	22,4	(11088)	AGT	S	12,6	(6237)
AAC	N	22,8	(11284)	AGC	S	11,3	(5594)
AAA	K	26,9	(13334)	AGA	R	14,8	(7337)
AAG	K	35,9	(17797)	AGG	R	13,3	(6574)
GAT	D	32,4	(16040)	GGT	G	20,9	(10353)
GAC	D	20,4	(10097)	GGC	G	13,4	(6650)
GAA	E	33,2	(16438)	GGA	G	22,3	(11022)
GAG	E	33,2	(16426)	GGG	G	13,0	(6431)

До того ж фахівець у даній галузі зрозуміє, що зміни можна вводити шляхом мутування послідовностей нуклеїнової кислоти, що призводить до змін в амінокислотній послідовності поліпептиду, що кодується, без зміни біологічної активності білків. Таким чином, варіантні молекули нуклеїнових кислот можна створювати шляхом введення однієї або декількох нуклеотидних замін, додавань та/або делецій у відповідну послідовність нуклеїнової кислоти, розкрити у даному документі, так що одна або декілька амінокислотних замін, додавань або делецій вводяться у кодований білок. Мутації можна вводити за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. Такі варіантні послідовності нуклеїнової кислоти також охоплюються даним винаходом.

Алельні варіанти, що зустрічаються в природних умовах, такі як ці, можна ідентифікувати із застосуванням добре відомих методик молекулярної біології, таких як, наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та методики гібридизації, як викладено у даному документі.

У деяких варіантах здійснення полінуклеотидів, що кодує поліпептид із SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10, являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геномної.

Варіантні нуклеотидні послідовності також включають синтетично одержані нуклеотидні послідовності, такі як одержані, наприклад, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, але які все ще кодують пестицидний білок згідно з варіантами здійснення, такий як мутантний токсин. Загалом варіанти конкретної нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення будуть мати послідовність, щонайменше на приблизно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну конкретній нуклеотидній послідовності при визначенні за допомогою програм для вирівнювання послідовностей, описаних в інших місцях у даному документі, із використанням параметрів за замовчуванням. Варіант нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення може відрізнятися від даної послідовності лише 1-15 нуклеотидами, лише 1-10, як, наприклад, 6-10, лише 5, лише 4, 3, 2 або навіть 1 нуклеотидом.

Варіанти конкретної нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення (тобто ілюстративної нуклеотидної послідовності) також можна оцінювати шляхом порівняння відсоткової ідентичності послідовності для поліпептиду, що кодується варіантною нуклеотидною послідовністю, та поліпептиду, що кодується еталонною нуклеотидною послідовністю. Таким чином, наприклад, розкриті виділені нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептид із даною відсотковою ідентичністю послідовності щодо поліпептиду із SEQ ID NO 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10. Відсоткову ідентичність послідовності для будь-яких двох поліпептидів можна розрахувати за допомогою програм для вирівнювання послідовностей, описаних в інших місцях у даному документі, із застосуванням параметрів за замовчуванням. При оцінці будь-якої заданої пари полінуклеотидів згідно з варіантами здійснення шляхом порівняння відсоткової ідентичності послідовності, спільної для двох поліпептидів, які вони кодують, послідовності двох поліпептидів, що кодуються, ідентичні щонайменше на приблизно 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, зазвичай щонайменше на приблизно 75 %, 80 %, 85 %, щонайменше на приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % або щонайменше на приблизно 98 %, 99 % або більше.

Використовуваний у даному документі термін "варіантний білок" охоплює поліпептиди, що одержані з нативного білка: шляхом делеції (так званого усічення) або додавання однієї або декількох амінокислот на N-кінці та/або C-кінці нативного білка; делеції або додавання однієї або декількох амінокислот в одному або декількох сайтах у нативному білку або заміни однієї або декількох амінокислот в одному або декількох сайтах у нативному білку. Відповідно, термін "варіантний білок" охоплює біологічно активні фрагменти нативного білка, які містять достатнє число суміжних амінокислотних залишків для збереження біологічної активності нативного

білка, тобто для того, щоб він мав пестицидну активність. Така пестицидна активність може бути відмінною або поліпшеною порівняно з нативним білком, або вона може бути незмінною за умови, що пестицидна активність зберігається.

5 Варіантні білки, що охоплюються варіантами здійснення, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати необхідну біологічну активність нативного білка, тобто пестицидну активність, як описано у даному документі. Такі варіанти можуть бути результатом, наприклад, генетичного поліморфізму або маніпуляції, яку здійснює людина. Біологічно активні варіанти нативного пестицидного білка згідно з варіантами здійснення будуть мати послідовність, щонайменше на приблизно 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 10 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності для нативного білка при визначенні за допомогою програм для вирівнювання послідовностей, описаних в інших місцях у даному документі, із використанням параметрів за замовчуванням. Біологічно активний варіант білка згідно з варіантами здійснення може відрізнятися від даного білка лише 1-15 амінокислотними залишками, лише 1-10, як, наприклад, 15 6-10, лише 5, лише 4, 3, 2 або навіть 1 амінокислотним залишком.

У деякому варіанті здійснення інсектицидний поліпептид має послідовність, щонайменше на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності із SEQ ID NO: 2.

20 У деякому варіанті здійснення інсектицидний поліпептид має послідовність, щонайменше на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності із SEQ ID NO: 4.

У деякому варіанті здійснення інсектицидний поліпептид має послідовність, щонайменше на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності із SEQ ID NO: 6.

25 У деякому варіанті здійснення інсектицидний поліпептид має послідовність, щонайменше на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності із SEQ ID NO: 8.

У деякому варіанті здійснення інсектицидний поліпептид має послідовність, щонайменше на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 30 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну амінокислотній послідовності із SEQ ID NO: 10.

У деяких варіантах здійснення поліпептид характеризується модифікованою фізичною властивістю. Використовуваний у даному документі термін "фізична властивість" відноситься до будь-якого параметра, який є придатним для опису фізико-хімічних характеристик білка. Використовувані в даному документі терміни "фізична властивість, що становить інтерес" та 35 "властивість, що становить інтерес" застосовуються взаємозамінно для позначення фізичних властивостей білків, які досліджуються та/або модифікуються. Приклади фізичних властивостей включають без обмеження сумарний поверхневий заряд та розподілення зарядів на поверхні білка, сумарну гідрофобність та розподілення гідрофобних залишків на поверхні білка, щільність поверхневого заряду, щільність гідрофобності поверхні, загальну кількість 40 поверхневих груп, здатних до іонізації, поверхневий натяг, розмір білка та його розподілення у розчині, температуру плавлення, теплоємність та другий віріальний коефіцієнт. Приклади фізичних властивостей також включають без обмеження розчинність, фолдинг, стабільність та засвоюваність. У деяких варіантах здійснення поліпептид характеризується підвищеною перетравністю фрагментів, одержаних у результаті протеолітичного розщеплення, у кишечнику 45 комах. Моделі для перетравлювання за допомогою штучного шлункового соку відомі спеціалісту в даній галузі техніки (Fuchs, R.L. and J.D. Astwood. Food Technology 50: 83-88, 1996; Astwood, J.D., et al Nature Biotechnology 14: 1269-1273, 1996; Fu TJ et al J. Agric Food Chem. 50: 7154-7160, 2002).

Крім того, варіантами здійснення охоплюється мікроорганізм, трансформований 50 щонайменше однією нуклеїною кислотою згідно з варіантами здійснення, касетою експресії, яка містить нуклеїнову кислоту, або вектором, який містить касету експресії. У деяких варіантах здійснення мікроорганізм являє собою мікроорганізм, що розмножується на рослинах. Варіант здійснення даного винаходу відноситься до інкапсульованого пестицидного білка, який міститься у трансформованому мікроорганізмі, здатному до експресії щонайменше одного 55 пестицидного білка згідно з варіантами здійснення.

Варіанти здійснення передбачають пестицидні композиції, що містять трансформований мікроорганізм згідно з варіантами здійснення. У таких варіантах здійснення трансформований мікроорганізм звичайно присутній у пестицидній композиції в пестицидно ефективній кількості разом із придатним носієм. Варіантами здійснення також охоплюються пестицидні композиції, 60 що містять виділений білок згідно з варіантами здійснення, окремо або в комбінації з

трансформованим організмом згідно з варіантами здійснення, та/або інкапсульований пестицидний білок згідно з варіантами здійснення в інсектицидно ефективній кількості разом з придатним носієм.

5 Варіанти здійснення додатково передбачають спосіб розширення спектра комах-мішеней шляхом застосування пестицидного білка згідно з варіантами здійснення в комбінації щонайменше з одним іншим або "другим" пестицидним білком. У способах згідно з варіантами здійснення можна використовувати будь-який пестицидний білок, відомий з рівня техніки. Такі пестицидні білки включають без обмеження Bt-токсини, інгібітори протеаз, α -амілази та пероксидази.

10 Варіантами здійснення також охоплюються трансформовані або трансгенні рослини, що містять щонайменше одну нуклеотидну послідовність згідно з варіантами здійснення. У деяких варіантах здійснення рослина стабільно трансформована нуклеотидною конструкцією, яка містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність згідно з варіантами здійснення, функціонально пов'язану з промотором, який керує експресією в рослинній клітині.

15 Використовувані в даному документі терміни "трансформована рослина" та "трансгенна рослина" відносяться до рослини, яка містить гетерологічний полінуклеотид у своєму геномі. Загалом гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований у геном трансгенної або трансформованої рослини таким чином, що полінуклеотид передається наступним поколінням. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований у геном окремо або як частина рекомбінантної касети експресії.

20 Слід розуміти, що використовуваний у даному документі термін "трансгенний" включає будь-яку клітину, клітинну лінію, калюс, тканину, частину рослини або рослину, генотип якої був змінений у результаті присутності гетерологічної нуклеїнової кислоти, у тому числі такі трансгенні об'єкти, які спочатку були зміненими таким чином, а також такі трансгенні об'єкти, які були створені шляхом статевих схрещувань або нестатевого розмноження з вихідного трансгенного об'єкта. Використовуваний у даному документі термін "трансгенний" не охоплює зміну геному (хромосомного або позахромосомного) за допомогою традиційних способів селекції рослин або трансгенних об'єктів, що зустрічаються в природних умовах, наприклад, випадкове перехресне запилення, інфекцію, спричинену нерекомбінантним вірусом, трансформацію нерекомбінантними бактеріями, нерекомбінантну транспозицію або спонтанну мутацію.

25 Використовуваний у даному документі термін "рослина" включає цілі рослини, органи рослин (наприклад, листя, стебла, корені тощо), насіння, рослинні клітини та потомство таких. Частини трансгенних рослин знаходяться у межах обсягу варіантів здійснення та передбачають, наприклад, рослинні клітини, рослинні протопласти, тканинні культури рослинних клітин, з яких можна регенерувати рослини, рослинні калюси, скупчення рослинних клітин та рослинні клітини, які є інтактними у рослинах або частинах рослин, таких як зародки, пилки, сім'ябруньки, насіння, листя, квітки, гілки, плоди, зерна, колоски, стрижні качанів, лушпиння, стебла, корені, верхівки коренів, пиляки тощо, що походять зі трансгенних рослин або їхнього потомства, раніше

40 трансформованих молекулою ДНК згідно з варіантами здійснення та, таким чином, щонайменше частково складаються з трансгенних клітин. Клас рослин, які можна застосовувати в способах згідно з варіантами здійснення звичайно настільки широкий, як клас вищих рослин, які піддають методикам трансформації, що включає як однодольні, так і дводольні рослини.

45 Хоча варіанти здійснення не залежать від конкретного біологічного механізму підвищення стійкості рослини до шкідника рослин, експресія нуклеотидних послідовностей згідно з варіантами здійснення у рослині може приводити в результаті до продукування пестицидних білків згідно з варіантами здійснення та до підвищення стійкості рослини до шкідника рослин. Рослини згідно з варіантами здійснення знаходять застосування у сільському господарстві у способах здійснення впливу на комах-шкідників. Певні варіанти здійснення передбачають

50 трансформовані культурні рослини, такі як, наприклад, рослини маїсу, які знаходять застосування в способах здійснення впливу на комах-шкідників рослини, таких як, наприклад, лускокрилі шкідники.

"Досліджувана рослина або рослинна клітина" являють собою рослину або рослинну клітину, в яких генетична зміна, така як трансформація, зачепила ген, що становить інтерес, або

55 являють собою рослину або рослинну клітину, які походять від рослини або клітини, змінених таким чином, та які містять зміну. "Контроль", або "контрольна рослина", або "контрольна рослинна клітина" надають точку відліку для вимірювання змін фенотипу досліджуваної рослини або рослинної клітини.

60 Контрольна рослина або рослинна клітина можуть являти собою, наприклад, (а) рослину або клітину дикого типу, тобто з таким самим генотипом, що й у вихідного матеріалу для

генетичної зміни, з використанням якого одержали в результаті досліджувану рослину або клітину; (b) рослину або рослинну клітину з таким самим генотипом, що й у вихідного матеріалу, але які були трансформовані нуль-конструкцією (тобто конструкцією, яка не здійснює відомого впливу на ознаку, що становить інтерес, такою як конструкція, яка містить маркерний ген); (c) рослину або рослинну клітину, які є нетрансформованим сегрегантом серед потомства досліджуваних рослини або рослинної клітини; (d) рослину або рослинну клітину, які генетично ідентичні досліджуваній рослині або рослинній клітині, але які не зазнавали впливу умов або стимулів, які будуть індукувати експресію гена, що становить інтерес, або (e) досліджувану рослину або рослинну клітину як такі в умовах, за яких ген, що становить інтерес, не експресується.

Фахівець у даній галузі техніки легко зрозуміє, що досягнення в галузі молекулярної біології, такі як сайт-специфічний та неспецифічний мутагенез, методики полімеразної ланцюгової реакції та методики білкової інженерії, забезпечують багатий набір інструментів та протоколів, придатних для застосування для зміни або конструювання як амінокислотної послідовності, так і генних послідовностей, які лежать в основі білків, що становлять інтерес із точки зору сільського господарства.

Таким чином, білки згідно з варіантами здійснення можна змінювати різними способами, включаючи амінокислотні заміни, делеції, усичення та вставки. Способи здійснення таких маніпуляцій, як правило, відомі з рівня техніки. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей пестицидних білків можна одержати шляхом введення мутацій у синтетичну нуклеїнову кислоту (наприклад, молекулу ДНК). Способи мутагенезу та внесення змін у нуклеїнову кислоту добре відомі з рівня техніки. Наприклад, сконструйовані зміни можна вводити із використанням методики опосередкованого олігонуклеотидами сайт-спрямованого мутагенезу. Див., наприклад, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; патент США № 4873192; Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) та джерела, процитовані в цих документах.

Піддані мутагенезу нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення можна модифікувати так, щоб змінити приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 або більше з амінокислот, що присутні у первинній послідовності поліпептиду, що кодується. Альтернативно можна вводити навіть ще більшу кількість змін щодо нативної послідовності таким чином, щоб у білка, що кодується, щонайменше приблизно 1 % або 2 %, або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, або 25 %, 30 %, 35 %, або 40 % або більше кодонів могли бути зміненими або іншим чином модифікованими порівняно з відповідним білком дикого типу. Таким же чином, у білка, що кодується, може бути щонайменше приблизно 1 %, або 2 %, або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, або 25 %, 30 %, 35 %, або 40 %, або більше додаткових кодонів порівняно з відповідним білком дикого типу. Слід розуміти, що піддані мутагенезу нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення, як передбачається, охоплюють біологічно функціональні еквівалентні пептиди, які мають пестицидну активність, таку як поліпшена пестицидна активність, яку визначають за антифідантними властивостями щодо личинок вогнівки кукурудзяної. Такі послідовності можуть виникнути внаслідок надлишковості кодонів та функціональної еквівалентності, які, як відомо, зустрічаються в природних умовах у послідовностях нуклеїнової кислоти та білках, що кодуються таким чином.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що додавання амінокислот та/або амінокислотні заміни звичайно базуються на відносній подібності заміників у боковому ланцюзі амінокислот, наприклад, їхній гідрофобності, заряді, розмірі тощо. Ілюстративні групи амінокислотних заміні, у яких беруться до уваги різні з вищевикладених характеристик, добре відомі фахівцю в даній галузі техніки та включають: аргінін та лізин; глутамат та аспартат; серин та треонін; глутамін та аспарагін; а також валін, лейцин та ізoleyцин.

Вказівки, що стосуються придатних амінокислотних заміні, які не впливають на біологічну активність білка, що становить інтерес, можна знайти в моделі Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включеній у даний документ за допомогою посилання. Можуть бути здійснені консервативні заміни, такі як заміщення однієї амінокислоти іншою з аналогічними властивостями.

Таким чином, гени та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення включають як послідовності, що зустрічаються в природних умовах, так і мутантні форми. Аналогічно білки згідно з варіантами здійснення охоплюють як білки та варіанти, що зустрічаються в природних

умовах (наприклад, усічені поліпептиди), так і їхні модифіковані (наприклад, мутантні) форми. Такі варіанти будуть зберігати необхідну пестицидну активність. Очевидно, що мутації, які будуть здійснені у нуклеотидній послідовності, що кодує варіант, не повинні виводити послідовність із рамки зчитування та загалом не будуть створювати комплементарні ділянки, які можуть утворювати вторинну структуру мРНК. Див. публікацію заявки на європейський патент № 75444.

Очікується, що делеції, вставки та заміни у білкових послідовностях, охоплені даним документом, не будуть призводити до радикальних змін характеристик білка. Проте, якщо важко передбачити точний ефект заміни, делеції або вставки перед її здійсненням, фахівець у даній галузі зрозуміє, що даний ефект будуть оцінювати за допомогою звичайних скринінгових аналізів, таких як аналізи з живленням комах. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) J. Econ. Entomol. 78: 290-293 та Czaplá and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485, включені в даний документ за допомогою посилання.

Варіантні нуклеотидні послідовності та білки також охоплюють послідовності та білки, одержані в результаті мутагенної та рекомбіногенної процедури, такої як ДНК-шафлінг. У випадку такої процедури можна здійснювати маніпуляції з однією або декількома різними кодувальними послідовностями для створення нового пестицидного білка, що має необхідні властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів створюють із популяції споріднених за послідовностями полінуклеотидів, що містять ділянки послідовностей, які характеризуються значною ідентичністю послідовності та можуть піддаватися гомологічній рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, із застосуванням цього підходу кодувальні послідовності повної довжини, мотиви у послідовностях, які кодують домен, що становить інтерес, або будь-який фрагмент нуклеотидної послідовності згідно з варіантами здійснення можна перетасувати між нуклеотидними послідовностями згідно з варіантами здійснення та відповідними частинами інших відомих нуклеотидних послідовностей *in vivo* з одержанням нового гена, який кодує білок із поліпшеною властивістю, що становить інтерес.

Властивості, що становлять інтерес, включають без обмеження пестицидну активність на одиницю пестицидного білка, стабільність білка та токсичність щодо видів, що не є мішенню, особливо людини, свійської худоби, а також рослин та мікробів, які експресують пестицидні поліпептиди згідно з варіантами здійснення. Варіанти здійснення не обмежуються конкретною стратегією шафлінгу, потрібно тільки, щоб щонайменше одна нуклеотидна послідовність згідно з варіантами здійснення або її частина була задіяна у такій стратегії шафлінгу. У шафлінгу можуть бути задіяні тільки нуклеотидні послідовності, розкриті у даному документі, або він може додатково передбачати шафлінг інших нуклеотидних послідовностей, відомих із рівня техніки. Стратегії ДНК-шафлінгу відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 і 5837458.

Нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення також можна застосовувати для виділення відповідних послідовностей з інших організмів, зокрема з інших бактерій та більш конкретно з інших штамів *Bacillus*. Таким чином, такі способи, як ПЛР, гібридизація тощо, можна застосовувати для ідентифікації таких послідовностей з урахуванням гомології їхньої послідовності з послідовностями, викладеними у даному документі. Варіантами здійснення охоплюються послідовності, вибрані на основі ідентичності послідовності повним послідовностям, викладеним у даному документі, або їхнім фрагментам. Такі послідовності включають послідовності, які є ортологами розкритих послідовностей. Термін "ортологи" відноситься до генів, що походять від спільного предкового гена та виявляються у різних видів унаслідок видоутворення. Гени, які виявляються у різних видів, вважаються ортологами, якщо їхні нуклеотидні послідовності та/або білкові послідовності, що кодуються ними, мають значний ступінь ідентичності, як визначено в інших розділах у даному документі. Функції ортологів часто є висококонсервативними серед видів.

У підході, оснований на ПЛР, олігонуклеотидні праймери можна сконструювати для застосування у ПЛР-реакціях для ампліфікації відповідних послідовностей ДНК з кДНК або геномної ДНК, екстрагованих з будь-якого організму, що становить інтерес. Способи конструювання ПЛР-праймерів та ПЛР-клонування загалом відомі з рівня техніки та розкриті в Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), надалі "Sambrook". Див. також Innis et al., eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, New York) та Innis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods

Manual (Academic Press, New York). Відомі способи ПЛР включають без обмеження способи із застосуванням парних праймерів, гніздових праймерів, окремих специфічних праймерів, вироджених праймерів, ген-специфічних праймерів, вектор-специфічних праймерів, праймерів, що частково не збігаються тощо

5 У випадку гібридизаційних методик усю відому нуклеотидну послідовність або її частину застосовують як зонд, який вибірково гібридується з іншими відповідними нуклеотидними послідовностями, що присутні у популяції клонуваних фрагментів геномної ДНК або фрагментів кДНК (тобто геномні бібліотеки або бібліотеки кДНК) з вибраного організму. Гібридизаційні
10 зонди можуть являти собою фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди, та їх можна помітити групою, яку можна виявити, такою як ³²P, або будь-яким іншим маркером, який можна виявити. Таким чином, наприклад, зонди для гібридизації можна одержати за допомогою мічення синтетичних олігонуклеотидів з урахуванням послідовностей згідно з варіантами здійснення. Способи одержання зондів для гібридизації та для створення бібліотек кДНК та геномних бібліотек, як правило, відомі з рівня техніки та розкриті в Sambrook.

Наприклад, повну послідовність, розкриту в даному документі, або одну або декілька її частин можна застосовувати як зонд, здатний специфічно гібридуватися з відповідними послідовностями та матричними РНК. Для забезпечення специфічної гібридизації у різних умовах такі зонди включають послідовності, що є унікальними щодо послідовностей згідно з
20 варіантами здійснення та зазвичай мають довжину щонайменше приблизно 10 або 20 нуклеотидів. Такі зонди можна застосовувати для ампліфікації відповідних послідовностей Сгу з вибраного організму за допомогою ПЛР. Цю методику можна застосовувати для виділення додаткових кодувальних послідовностей з потрібного організму або як діагностичний аналіз для визначення присутності кодувальних послідовностей в організмі. Методики гібридизації
25 включають гібридизаційний скринінг висіяних на чашку Петрі бібліотек ДНК (бляшок або колоній; див., наприклад, Sambrook).

Гібридизацію таких послідовностей можна проводити в жорстких умовах. Використовувані у даному документі терміни "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" відносяться до умов, за яких зонд буде гібридуватися зі своєю цільовою послідовністю у явно більшій мірі, ніж з
30 іншими послідовностями (наприклад, щонайменше у 2 рази, у 5 разів або у 10 разів більше порівняно з фоном). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних обставин. Шляхом регулювання жорсткості умов гібридизації та/або промивання можна ідентифікувати цільові послідовності, які на 100 % комплементарні зонду (гібридизація з гомологічним зондом). Альтернативно умови жорсткості можна регулювати для забезпечення
35 деякого помилкового спарювання в послідовностях, щоб виявляти більш низькі ступені подібності (гібридизація з гетерологічним зондом). Зазвичай зонд має довжину менше ніж приблизно 1000 або 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткі умови будуть такими, за яких концентрація солі становить менше ніж приблизно 1,5 М іонів Na, як правило, концентрація іонів Na (або інших солей) становить
40 приблизно 0,01-1,0 М при рН 7,0-8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °С для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60 °С для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорсткі умови також можуть бути досягнуті за допомогою додавання дестабілізуючих засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином 30-35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 %
45 SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °С та відмиванням 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М тринатрію цитрат) при 50-55 °С. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію у 40-45 % формаміді, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °С та відмивання у 0,5X-1X SSC при 55-60 °С. Ілюстративні умови високої жорсткості включають гібридизацію у 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °С та кінцеве відмивання у 0,1X SSC при 60-65 °С протягом
50 щонайменше приблизно 20 хвилин. Необов'язково буфери для відмивання можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації загалом становить менше ніж приблизно 24 години, звичайно від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, як правило, залежить від відмивання після гібридизації, причому ключовими факторами є іонна сила та температура кінцевого розчину для відмивання. Для гібридів ДНК-
55 ДНК T_m (температуру плавлення) можна апроксимувати з рівняння в Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$; де М являє собою молярність одновалентних катіонів, % GC являє собою відсоток гуанозинових та цитозинових нуклеотидів в ДНК, "% форм." являє собою відсотковий вміст формаміду в гібридизаційному розчині та L являє собою довжину гібрида в парах основ. T_m являє собою температуру (за визначеної іонної сили та рН), за якої 50 % комплементарної послідовності-

мішені гібридизуються з зондом, що ідеально збігається. Процедури відмивання, як правило, здійснюють щонайменше доти, доки не буде досягнута рівновага та доки не буде досягнутий низький фоновий рівень гібридизації, як, наприклад, протягом 2 годин, 1 години або 30 хвилин.

5 T_m знижується приблизно на 1 °C для кожного 1 % неспівпадіння; таким чином, T_m , умови гібридизації та/або відмивання можна регулювати для гібридизації послідовностей з бажаною ідентичністю. Наприклад, якщо здійснюють пошук послідовностей з ідентичністю >90 %, T_m можна знизити на 10 °C. Зазвичай жорсткі умови вибирають таким чином, щоб температура була на приблизно 5 °C нижче, ніж T_m для конкретної послідовності та комплементарної їй послідовності при визначеній іонній силі та pH. Проте за умов високої жорсткості можна
10 проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4 °C нижче, ніж T_m ; за умов помірної жорсткості можна проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижчій, ніж T_m ; в умовах низької жорсткості можна проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижчій, ніж T_m .

15 Фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що варіації жорсткості розчинів для гібридизації та/або відмивання по суті описані за допомогою рівняння, складів розчинів для гібридизації та відмивання та бажаної T_m . Якщо необхідний ступінь незбігів призводить у результаті до T_m нижче 45 °C (водний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), то концентрацію SSC можна підвищити для того, щоб можна було використовувати вищу температуру. Вичерпний посібник із гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти у Tijssen (1993) *Laboratory*
20 *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York) та Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. також Sambrook. Таким чином, виділені послідовності, які кодують білок Cru згідно з варіантами здійснення та гібридизуються у жорстких умовах з послідовностями Cru, розкритими у даному документі, або з їхніми фрагментами, охоплюються варіантами здійснення.

25 Наступні терміни застосовують для опису спорідненості послідовностей між двома або більше нуклеїновими кислотами або полінуклеотидами: (a) "еталонна послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність послідовності", (d) "відсоткова ідентичність послідовності" та (e) "значна ідентичність".

30 (a) Використовувана в даному документі "еталонна послідовність" являє собою задану послідовність, застосовувану як основа для порівняння послідовностей. Еталонна послідовність може являти собою скорочену версію або повну форму визначеної послідовності; наприклад, являти собою сегмент повнорозмірної кДНК або послідовності гена або всю кДНК або послідовність гена.

35 (b) Використовуване в даному документі "вікно порівняння" відноситься до неперервного та точно визначеного сегмента в послідовності полінуклеотиду, причому послідовність полінуклеотиду у вікні порівняння може передбачати додавання або делеції (тобто гепи) порівняно з еталонною послідовністю (яка не передбачає додавань або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Як правило, довжина вікна порівняння становить щонайменше 20 суміжних нуклеотидів та необов'язково може становити 30, 40, 50,
40 100 або більше. Фахівці в даній галузі техніки зрозуміють, що аби уникнути високої подібності з еталонною послідовністю внаслідок включення гепів в послідовність полінуклеотиду, як правило, вводиться штраф за геп, та його віднімають від кількості збігів.

45 Способи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі з рівня техніки. Таким чином, визначення відсоткової ідентичності послідовностей між будь-якими двома послідовностями можна виконувати із застосуванням математичного алгоритму. Необмежувальними прикладами подібних математичних алгоритмів є алгоритм за Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; алгоритм локального вирівнювання за Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; алгоритм глобального вирівнювання за Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; спосіб пошуку локального вирівнювання за Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; алгоритм за Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, який модифікований у Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

50 Для порівняння послідовностей можна використовувати комп'ютерні впровадження цих математичних алгоритмів, щоб визначити ідентичність послідовностей. Такі реалізації включають без обмеження CLUSTAL в програмі PC/Gene (доступна від Intelligenetics, Маунтін-В'ю, Каліфорнія); програму ALIGN (версія 2.0) та GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA та TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, версія 10 (доступні від Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Вирівнювання за допомогою цих програм можна виконувати із застосуванням параметрів за замовчуванням. Програма CLUSTAL добре описана в Higgins et al. (1988) *Gene* 73:237-244; та Durrenberger et al. (1989) *EMBO* 5:151-153; Albani et al. (1988)
60

Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65 та Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331. Програма ALIGN базується на алгоритмі з Myers and Miller (1988), згаданому вище. При порівнянні амінокислотних послідовностей у програмі ALIGN можна застосовувати таблицю ваги заміни залишків PAM120, штраф за подовження гепу 12 і штраф за відкриття гепу 4. Програми BLAST з Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403 базуються на алгоритмі з Karlin and Altschul, (1990), згаданому вище. Пошуки нуклеотидних послідовностей у BLAST можна виконувати за допомогою програми BLASTN за параметрів вага вирівнювання = 100, довжина слова = 12 з одержанням нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеотидній послідовності, яка кодує білок згідно з варіантами здійснення. Пошуки білкових послідовностей в BLAST можна виконувати за допомогою програми BLASTX за параметрів вага вирівнювання = 50, довжина слова = 3 з одержанням амінокислотних послідовностей, гомологічних білку або поліпептиду згідно з варіантами здійснення. Для одержання вирівнювань з гепами з метою порівняння можна використовувати Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, можна застосовувати PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для здійснення ітераційного пошуку, який виявляє віддалені зв'язки між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) вище. При використанні BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можна застосовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTN для нуклеотидних послідовностей, BLASTX для білків). Див. веб-сайт Національного центру біотехнологічної інформації в мережі Інтернет за адресою ncbi.nlm.nih.gov. Вирівнювання можна проводити вручну шляхом огляду.

Якщо не зазначено інше, значення ідентичності/подібності послідовностей, наведені у даному документі, відносяться до значення, одержаного за допомогою GAP версії 10 із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності і % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гепу 50, і штрафу за продовження гепу 3, і матриці заміни `nwsgapdna.stp`; % ідентичності та % подібності для амінокислотної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гепу 8, і штрафу за продовження гепу 2, і матриці заміни BLOSUM62; або будь-якої еквівалентної до неї програми. Використовуваний у даному документі термін "еквівалентна програма" відноситься до будь-якої програми для порівняння послідовностей, в якій для будь-яких двох розглянутих послідовностей існують вирівнювання з ідентичними збігами нуклеотидних або амінокислотних залишків та ідентичною відсотковою ідентичністю послідовності порівняно з відповідним вирівнюванням, здійснюваним за допомогою GAP версії 10.

У GAP використовується алгоритм за Needleman and Wunsch (1970), вище, для виявлення вирівнювання двох повних послідовностей, який максимально збільшує число збігів та зводить до мінімуму кількість гепів. GAP розглядає всі можливі варіанти вирівнювання та положення гепів та створює вирівнювання з найбільшою кількістю основ, що збіглися, та найменшим числом гепів. Вона дозволяє призначити штраф за відкриття гепу та штраф за продовження гепу в одиницях основ, що збіглися. У GAP необхідно додавати число штрафів за відкриття гепу до збігів для кожного гепу, який вводиться. Якщо вибраний штраф за продовження гепу більше нуля, у GAP необхідно, крім цього, додавати для кожного введеного гепу довжину гепу, помножену на штраф за продовження гепу. Значення за замовчуванням для штрафу за відкриття гепу та значення за замовчуванням для штрафу за подовження гепу в GCG Wisconsin Genetics Software Package версії 10 для білкових послідовностей становлять 8 та 2, відповідно. Для нуклеотидних послідовностей штраф за відкриття гепу за замовчуванням становить 50, у той час як штраф за подовження гепу за замовчуванням становить 3. Штрафи за відкриття гепу та за подовження гепу можуть бути виражені у вигляді цілого числа, вибраного з групи, що складається з цілих чисел від 0 до 200. Таким чином, наприклад, штрафи за відкриття гепу та за подовження гепу можуть становити 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 або більше.

GAP є одним представником родини найкращих засобів вирівнювання. Існує безліч представників цієї родини, але жоден інший представник не характеризується кращою якістю. GAP відображує чотири числові показники для вирівнювань: якість, співвідношення, ідентичність і подібність. Якість являє собою показник, який максимально збільшують для вирівнювання послідовностей. Співвідношення являє собою якість, поділену на число основ у більш короткому сегменті. Відсоткова ідентичність являє собою відсоток символів, які фактично збігаються. Відсоткова подібність являє собою відсоток символів, які є подібними. Символи, які знаходяться навпроти гепів, ігнорують. Подібність зараховують, якщо значення матриці заміни для пари символів більше або рівне 0,50, що є порогом подібності. Матриця заміни, що застосовується в версії 10 пакету програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics Software Package, являє собою BLOSUM62 (див. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

89:10915).

(c) Як застосовується у даному документі, "ідентичність послідовностей" або "ідентичність" в контексті двох послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептидних послідовностей стосується залишків у двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні для 5
максимальної відповідності в межах визначеного вікна порівняння. Якщо відсоткову ідентичність послідовностей застосовують щодо білків, розуміють, що положення залишків, які не є ідентичними, часто відрізняються за консервативними амінокислотними замінами, при цьому амінокислотні залишки замінені на інші амінокислотні залишки з аналогічними хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю) та, внаслідок цього, не змінюють функціональні властивості молекули. Якщо послідовності відрізняються консервативними замінами, то відсоткову ідентичність послідовностей можна підвищити з тим, щоб внести поправку на консервативну природу заміни. Кажуть, що послідовності, які відрізняються за такими консервативними замінами, характеризуються "подібністю послідовностей" або "подібністю". Засоби для здійснення такої корекції добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. 10
Як правило, це передбачає оцінку в балах консервативної заміни як часткового, а не повного незбігу, що, таким чином, збільшує відсоткову ідентичність послідовностей. Таким чином, наприклад, якщо ідентичній амінокислоті присвоюють бал 1, а неконсервативній заміні присвоюють бал нуль, то консервативній заміні присвоюють бал від нуля до 1. Оцінку консервативних замін у балах розраховують, наприклад, як реалізовано в програмі PC/GENE (Intelligenetics, Маунтін-В'ю, Каліфорнія). 20

(d) Як використовується в даному документі, "відсоткова ідентичність послідовностей" означає значення, визначене за допомогою порівняння двох послідовностей з оптимальним вирівнюванням у межах вікна порівняння, де частина послідовності полінуклеотиду у вікні порівняння може передбачати додавання або делеції (тобто гепи) порівняно з еталонною послідовністю (яка не передбачає додавань або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Відсоток розраховують шляхом визначення числа положень, в яких ідентична основа нуклеїнової кислоти або амінокислотний залишок зустрічаються в обох послідовностях, з одержанням числа положень, що збігаються, шляхом ділення кількості положень, що збігаються, на загальну кількість положень в інтервалі порівняння та множення результату на 100 з одержанням відсоткової ідентичності послідовності. 25
30

(e)(i) Термін "значна ідентичність" послідовностей полінуклеотидів означає, що полінуклеотид містить послідовність, яка щонайменше на 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більше ідентична при порівнянні з еталонною послідовністю за допомогою однієї з описаних програм для вирівнювання з використанням стандартних параметрів. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що дані значення можна відповідним чином відкоригувати для визначення відповідної ідентичності білків, кодованих двома нуклеотидними послідовностями з урахуванням виродженості кодону, амінокислотної подібності, розташування рамки читування тощо. Значна ідентичність амінокислотних послідовностей для даних цілей зазвичай означає, що послідовності ідентичні щонайменше на 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більше. 35
40

Іншим показником того, що нуклеотидні послідовності мають значний ступінь ідентичності, є те, що дві молекули гібридизуються одна з одною за жорстких умов. Зазвичай жорсткі умови вибирають так, щоб температура була приблизно на 5 °C нижчою за T_m для конкретної послідовності за певної іонної сили та рН. Однак жорсткі умови охоплюють температури в діапазоні від приблизно 1 °C до приблизно 20 °C нижче за T_m залежно від необхідного ступеню жорсткості, що в іншому випадку зазначено в даному документі. Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються одна з одною в жорстких умовах, все ще є значно ідентичними, якщо поліпептиди, які вони кодуєть, є значно ідентичними. Це може бути у випадку, наприклад, якщо копія нуклеїнової кислоти створена з використанням максимальної виродженості кодона, допустимої генетичним кодом. Одним показником того, що дві послідовності нуклеїнової кислоти значно ідентичними, є те, що поліпептид, який кодується першою нуклеїновою кислотою, є імунологічно перехресно-реагуючим із поліпептидом, кодованим другою нуклеїновою кислотою. 45
50

(e)(ii) Термін "значна ідентичність" у контексті пептиду вказує на те, що пептид містить послідовність, щонайменше на 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більше ідентичну еталонній послідовності в межах певного вікна порівняння. Оптимальне вирівнювання для даних цілей можна провести із застосуванням алгоритму глобального вирівнювання за Needleman and Wunsch (1970), вище. Ознакою того, що дві пептидні послідовності є значно ідентичними, є те, що один пептид є імунологічно реактивним із антитілами, виробленими до другого пептиду. Отже, пептид є значно ідентичним до другого пептиду, наприклад, у випадку, коли два пептиди відрізняються лише консервативною заміною. Пептиди, які є "значною мірою подібними", мають 60

загальні послідовності, як відзначалося вище, за винятком того, що положення залишків, які не є ідентичними, можуть відрізнятися за консервативними амінокислотними змінами.

Застосування терміну "нуклеотидні конструкції" у даному документі не призначене обмежувати варіанти здійснення нуклеотидними конструкціями, які містять ДНК. Фахівці в даній галузі розуміють, що нуклеотидні конструкції, зокрема полінуклеотиди та олігонуклеотиди, які складаються з рибонуклеотидів та комбінацій рибонуклеотидів та дезоксирибонуклеотидів, також можна застосовувати в способах, розкритих у даному документі. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення додатково охоплюють усі комплементарні форми таких конструкцій, молекул та послідовностей. Крім того, нуклеотидні конструкції, нуклеотидні молекули та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення охоплюють усі нуклеотидні конструкції, молекули та послідовності, які можна використовувати в способах згідно з варіантами здійснення для трансформації рослин, у тому числі без обмеження, які складаються з дезоксирибонуклеотидів, рибонуклеотидів та їх комбінацій. Такі дезоксирибонуклеотиди та рибонуклеотиди передбачають як молекули, що трапляються в природі, так і синтетичні аналоги. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти та нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення також охоплюють усі форми нуклеотидних конструкцій, у тому числі без обмеження одониткові форми, двониткові форми, шпильки, структури "стебло-та-петля" тощо.

Додатковий варіант здійснення відноситься до трансформованого організму, такого як організм, вибраний із групи, що складається з рослинних клітин та клітин комах, бактерій, дріжджів, бакуловірусів, найпростіших, нематод та водоростей. Трансформований організм містить молекулу ДНК згідно з варіантами здійснення, касету експресії, яка містить вказану молекулу ДНК, або вектор, який містить вказану касету експресії, які можуть бути стабільно вбудованими в геном трансформованого організму.

Послідовності згідно з варіантами здійснення передбачені у складі конструкцій ДНК для експресії в організмі, який становить інтерес. Конструкції будуть включати 5'- та 3'-регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з послідовністю згідно з варіантами здійснення. Використовуваний у даному документі термін "функціонально пов'язані" відноситься до функціонального зв'язку між промотором та іншою послідовністю, де послідовність промотора ініціює та опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, що відповідає другій послідовності. Зазвичай функціонально пов'язаний означає, що послідовності нуклеїнової кислоти, які пов'язані, є суміжними, та у випадку, коли необхідно з'єднати дві білок-кодувальні ділянки, вони є суміжними та знаходяться у одній рамці зчитування. Конструкція може додатково містити щонайменше один додатковий ген, який підлягає введенню в організм шляхом котрансформації. Альтернативно додатковий ген(гени) може забезпечуватися у декількох ДНК-конструкціях.

Така ДНК-конструкція забезпечена декількома сайтами рестрикції для вставки послідовності Сгу-токсину, транскрипція якої буде регулюватися регуляторними ділянками. ДНК-конструкція може додатково містити гени селективних маркерів.

У напрямку транскрипції 5' - 3' ДНК-конструкція буде включати ділянку ініціації транскрипції та трансляції (тобто промотор), послідовність ДНК згідно з варіантами здійснення та ділянку термінації транскрипції та трансляції (тобто ділянку термінації), які функціонують в організмі, який слугує хазяїном. Ділянка ініціації транскрипції (тобто промотор) може бути нативною, аналогічною, чужорідною або гетерологічною щодо організму-хазяїна та/або послідовності згідно з варіантами здійснення. Крім того, промотор може бути природною послідовністю або, як альтернатива, синтетичною послідовністю. Використовуваний у даному документі термін "чужорідний" вказує на те, що промотор не знайдений у нативному організмі, в який введений промотор. Якщо промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" щодо послідовності згідно з варіантами здійснення, вважається, що промотор не є нативним або промотором, який зустрічається в природі, для функціонально пов'язаної послідовності згідно з варіантами здійснення. Як використовується в даному документі, химерний ген містить кодувальну послідовність, функціонально пов'язану з ділянкою ініціації транскрипції, яка є гетерологічною для кодувальної послідовності. Якщо промотор є нативною або природною послідовністю, експресія функціонально пов'язаної послідовності змінена порівняно з експресією дикого типу, що приводить до зміни фенотипу.

Ділянка термінації може бути нативною щодо ділянки ініціації транскрипції, може бути нативною щодо функціонально зв'язаної послідовності ДНК, що становить інтерес, може бути нативною щодо рослини-хазяїна або може бути одержана з іншого джерела (тобто чужорідна або гетерологічна для промотора, послідовності, що становить інтерес, рослини-хазяїна або будь-якої їх комбінації).

Придатні ділянки термінації доступні з Ті-плазміди *A. tumefaciens*, такі як ділянки термінації генів октопінсинтази та нопалінсинтази. Див. також Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903 та Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

За необхідності нуклеїнову кислоту можна оптимізувати для посилення експресії в організмі-хазяїні. Таким чином, якщо організм-хазяїн є рослиною, для поліпшення експресії можна синтезувати синтетичні нуклеїнові кислоти із застосуванням кодонів, переважних для рослин. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 стосовно обговорення застосування кодонів, переважних для хазяїна. Наприклад, хоча послідовності нуклеїнової кислоти згідно з варіантами здійснення можуть експресуватися як у видів однодольних, так і дводольних рослин, послідовності можна модифікувати з урахуванням специфічних переваг щодо кодонів та переваг за вмістом GC у однодольних або дводольних, якщо було показано, що переваги відрізняються (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Таким чином, кодон, переважний для маїсу, для конкретної амінокислоти можна встановити з відомих генних послідовностей маїсу. Дані про частоту використання кодонів у маїсу для 28 генів із рослин маїсу наведені в таблиці 4 в Murray et al., вище. З рівня техніки доступні способи синтезу генів, переважних для рослин. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831 та 5436391; та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включені в даний документ за допомогою посилання.

Відомі додаткові модифікації послідовності для посилення експресії гена у клітинного хазяїна. Вони включають вилучення послідовностей, що кодують хибні сигнали поліаденілювання, сигнали сайту сплайсингу екзонів та інтронів, транспозон-подібні повтори та інші добре вивчені послідовності, які можуть здійснювати шкідливий вплив на експресію гена. Вміст GC в послідовності можна відкорегувати до рівнів, середніх для даного клітинного хазяїна, розрахованих з урахуванням відомих генів, експресованих у клітині-хазяїні. Використовуваний у даному документі термін "клітина-хазяїн" відноситься до клітини, яка містить вектор та яка підтримує реплікацію та/або експресію передбачуваних векторів експресії. Клітини-хазяїни можуть бути прокаріотичними клітинами, такими як *E. coli*, або еукаріотичними клітинами, такими як клітини дріжджів, комах, амфібій або ссавців, або клітинами однодольних або дводольних рослин. Прикладом клітини-хазяїна, яка відноситься до однодольної рослини, є клітина-хазяїн маїсу. Якщо можливо, послідовність модифікують, аби запобігти утворенню прогнозованих шпилькових вторинних структур мРНК.

Касети експресії можуть додатково містити 5'-лідерні послідовності. Такі лідерні послідовності можуть сприяти посиленню трансляції. Трансляційні лідерні послідовності відомі з рівня техніки та включають лідерні послідовності пікорнавірусів, наприклад лідерну послідовність EMCV (5'-некодуєча ділянка геному вірусу енцефаломіокардиту) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); лідерні послідовності потівірусів, наприклад лідерну послідовність TEV (вірусу гравіювання тютюну) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233-238), лідерну послідовність MDMV (вірусу карликової мозаїки кукурудзи), білка, який зв'язує важкий ланцюг імуноглобуліну людини (BiP) (Masejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94); лідерну послідовність мРНК білка оболонки вірусу мозаїки люцерни, що не трансклюється (PHK-4 AMV) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622-625); лідерну послідовність вірусу тютюнової мозаїки (TMV) (Gallie et al. (1989) в *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256) та лідерну послідовність вірусу хлоротичної плямистості маїсу (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). Див. також Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968.

Під час одержання касети експресії з різноманітними фрагментами ДНК можна проводити маніпуляції так, щоб одержати послідовності ДНК в належній орієнтації та за необхідності в належній рамці зчитування. З цією метою для з'єднання фрагментів ДНК можна використовувати адаптери або лінкери, або можна залучати інші маніпуляції для забезпечення прийнятних сайтів рестрикції, видалення надлишкової ДНК, видалення сайтів рестрикції тощо. Для цього можна задіяти мутагенез *in vitro*, репарацію за допомогою праймерів, рестрикцію, гібридизацію, повторні заміни, наприклад, транзиції та трансверсії.

При практичному здійсненні варіантів здійснення можна застосовувати низку промоторів. Промотори можна вибирати з урахуванням необхідного результату. Нуклеїнові кислоти можна об'єднати з конститутивними, тканинопереважними, індуктивними або іншими промоторами для експресії в організмі-хазяїні. Придатні конститутивні промотори для застосування в рослинній клітині-хазяїні включають, наприклад, коровий промотор промотора *Rsyn7* та інші конститутивні промотори, розкриті в документі WO 99/43838 та патенті США № 6072050; коровий промотор 35S *CaMVp* (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); промотор гена актину рису (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); убівітиновий промотор (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:

619-632 та Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); промотор рЕМU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); промотор гена MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); промотор гена ALS (патент США № 5659026) тощо. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, такі, що обговорюються в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 та 6177611.

Залежно від необхідного результату може бути корисно експресувати ген за допомогою індуктивного промотора. Особливий інтерес для регуляції експресії нуклеотидних послідовностей згідно з варіантами здійснення у рослин становлять промотори, що індукуються пораненням. Такі промотори, що індукуються пораненням, можуть реагувати на пошкодження, спричинене живленням комахи, та вони включають промотор гена інгібітора протеїнази картоплі (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); промотори генів *wun1* та *wun2*, патент США № 5428148; промотори генів *win1* та *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); промотор гена системіну (McGurl et al. (1992) *Science* 225: 1570-1573); промотор гена *WIP1* (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); промотор гена *MPI* (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2): 141-150); тощо, включені в даний документ за допомогою посилання.

Крім того, у способах та нуклеотидних конструкціях згідно з варіантами здійснення можна використовувати промотори, що індукуються патогеном. Такі промотори, що індукуються патогеном, включають промотори з генів, пов'язаних із патогенезом білків (PR білків), які індукуються після інфікування патогеном; наприклад, PR білків, SAR білків, бета-1,3-глюканази, хітинази тощо. Див., наприклад, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4: 645-656 та Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4: 111-116. Див. також WO 99/43819, включену в даний документ за допомогою посилання.

Становлять інтерес промотори, які експресуються локально в місці зараження патогеном або поруч із ним. Див., наприклад, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98 та Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Див. також Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; патент США № 5750386 (індукований нематодами); а також джерела, цитовані в цих документах. Особливий інтерес становить індукований промотор для гена маїсу PRms, експресія якого індукується патогеном *Fusarium moniliforme* (див., наприклад, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Path.* 41:189-200).

Регульовані хімічними речовинами промотори можна застосовувати для модуляції експресії гена в рослині за допомогою внесення екзогенного хімічного регулятора. Залежно від мети промотор може бути промотором, що індукується хімічною речовиною, в даному випадку застосування хімічної речовини індукує експресію гена, або репресованим хімічною речовиною промотором, у даному випадку застосування хімічної речовини пригнічує експресію гена. Промотори, що індукується хімічними речовинами, відомі з рівня техніки та включають без обмеження промотор гена *In2-2* маїсу, який активується антидотами до бензолсульфонамідних гербіцидів, промотор гена *GST* маїсу, який активується гідрофобними електрофільними сполуками, які застосовуються як досходові гербіциди, та промотор гена *PR-1a* тютюну, який активується саліциловою кислотою. Інші регульовані хімічними речовинами промотори, які становлять інтерес, включають чутливі до стероїдів промотори (див., наприклад, промотор, що індукується глюкокортикоїдами, в Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 та McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) та промотори, що індукуються тетрацикліном та репресуються тетрацикліном (див., наприклад, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237 та патенти США №№ 5814618 та 5789156), включені в даний документ за допомогою посилання.

Тканинопереважні промотори можна використовувати для цілеспрямованого посилення експресії пестицидного білка в межах конкретної тканини рослини. Тканинопереважні промотори включають промотори, що обговорюються в Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590 та Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. У разі потреби такі промотори можна модифікувати з одержанням слабкої експресії.

Промотори, активні переважно у листі, відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Yamamoto et

al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3:509-18; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6):1129-1138 та Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590.

5 Відомими є промотори, активні переважно в коренях, або промотори, специфічні щодо кореня, та їх можна вибирати з багатьох доступних з літератури або виділених *de novo* з різноманітних сумісних видів. Див., наприклад, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (специфічний щодо кореня ген глутамінсинтетази *coi*); Keller and Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3(10):1051-1061 (специфічний щодо кореня регуляторний елемент у гені GRP 1.8 квасолі звичайної); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (специфічний щодо кореня промотор гена манопінсинтази (MAS) з *Agrobacterium tumefaciens*) та Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (кДНК-клон повної довжини, який кодує цитозольну глутамінсинтетазу (GS), яка експресується в коренях та кореневих бульбочках *coi*). Див. також Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2(7):633-641, де описані два специфічних щодо кореня промотори, виділені з генів гемоглобіну азотфіксуючої рослини *Parasponia andersonii*, яка не належить до бобових, та спорідненої рослини, яка не належить до азотфіксуючих та яка не відноситься до бобових, *Trema tomentosa*. Промотори цих генів були пов'язані з репортерним геном β -глюкуронідази та введені як у *Nicotiana tabacum*, яка не належить до бобових, так і у бобову рослину *Lotus corniculatus*, та при цьому в обох випадках активність промотора, специфічна щодо кореня, зберігалася. Leach та Aoyagi (1991) описують свій аналіз промоторів, які забезпечують високий рівень експресії генів *rolC* та *rolD* *Agrobacterium rhizogenes*, які індукують розростання коренів (див. *Plant Science* (Limerick) 79(1):69-76). Автори дійшли висновку, що в цих промоторах енхансер та тканинопереважні ДНК-детермінанти розділені. Teeri et al. (1989) застосовували злиття гена з *lacZ* для того, щоб показати, що ген із Т-ДНК *Agrobacterium*, який кодує октопінсинтазу, є особливо активним в епідермісі кінчика кореня та що ген TR2' є специфічним щодо кореня в інтактній рослині та стимулюється при пораненні тканини листа, що є особливо бажаною комбінацією характеристик для застосування з інсектицидним або ларвіцидним геном (див. *EMBO J.* 8(2):343-350). Ген TR1', злитий з *prtII* (неоміцинфосфотрансфераза II), продемонстрував аналогічні характеристики. Додаткові переважні для кореня промотори включають промотор гена *VfENOD-GRP3* (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29(4):759-772) та промотор *rolB* (Carana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25(4):681-691. Див. також патенти США №№ 5837876; 5750386; 5633363; 5459252; 5401836; 5110732 та 5023179.

Промотори, "активні переважно в насінні", включають як промотори, "специфічні щодо насіння" (промотори, які активні під час розвитку насіння, такі як промотори запасних білків насіння), а також промотори "проростання насіння" (промотори, які активні під час проростання насіння). Див. Thompson et al. (1989) *BioEssays* 10:108, включену в даний документ за допомогою посилання. Такі промотори, активні переважно в насінні, включають без обмеження промотори генів *Cim1* (транскрипт, який індукований перивітальним цитокиніном); *cZ19B1* (19 кДа зеїн маїсу) та *milps* (міо-інозитол-1-фосфатсинтаза); (див. патент США № 6225529, включений у даний документ за допомогою посилання). Промотори генів гамма-зеїну та *Glob-1* являють собою промотори, специфічні щодо ендосперму. У дводольних рослин промотори, специфічні щодо насіння, включають без обмеження промотори генів β -фазеоліну квасолі, напіну, β -конгліциніну, лектину *soi*, круциферину тощо. В однодольних рослин промотори, специфічні щодо насіння, включають без обмеження промотори генів 15 кДа зеїну, 22 кДа зеїну, 27 кДа зеїну, σ -зеїну, *waxy*, *shrunken 1*, *shrunken 2*, глобуліну 1 маїсу тощо. Див. також включений у даний документ за допомогою посилання документ WO 00/12733, де розкриті промотори, активні переважно в насінні, з генів *end1* та *end2*. Промотор, що характеризується "переважною" експресією у конкретній тканині, експресується в такій тканині більшою мірою, ніж щонайменше у одній іншій рослинній тканині. Для деяких промоторів, активних переважно у певній тканині, показана експресія майже виключно в конкретній тканині.

Якщо потребується низький рівень експресії, будуть застосовуватися слабкі промотори. Зазвичай використовуваний у даному документі термін "слабкий промотор" стосується промотора, який керує експресією кодувальної послідовності на низькому рівні. Під низьким рівнем експресії мають на увазі рівні від приблизно 1/1000 транскриптів до приблизно 1/100000 транскриптів, до приблизно 1/500000 транскриптів. Альтернативно зрозуміло, що термін "слабкі промотори" також охоплює промотори, які керують експресією лише в деяких клітинах та не керують в інших, що призводить до загального низького рівня експресії. Якщо промотор керує експресією з неприйнятно високими рівнями, частини промоторної послідовності можна видаляти або модифікувати для зниження рівнів експресії.

60 Такі слабкі конститутивні промотори включають, наприклад, коровий промотор промотора

Rsyn7 (документ WO 99/43838 та патент США № 6072050), коровий промотор 35S CaMV тощо. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, розкриті в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 та 6177611, включені у даний документ за допомогою посилання.

5 Зазвичай касета експресії буде містити ген селективного маркера для відбору трансформованих клітин. Гени селективних маркерів застосовують для відбору трансформованих клітин або тканин. Гени маркерів включають у себе гени, які відповідають за стійкість до антибіотиків, такі як гени, що кодують неоміцин-фосфотрансферазу II (NEO) та гіроміцин-фосфотрансферазу (HPT), а також гени, які забезпечують стійкість до гербіцидних сполук, таких як глүфосинат амонію, бромоксиніл, імідазолінони та 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). Додаткові приклади придатних генів селективних маркерів включають без обмеження гени, які кодують ознаку стійкості до хлорамфеніколу (Herrera Estrella et al. (1983) EMBO J. 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella et al. (1983) Nature 303:209-213 та Meijer et al. (1991) Plant Mol. Biol. 16:807-820); стрептоміцину (Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 210:86-91); спектиноміцину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) Transgenic Res. 5:131-137); блеоміцину (Hille et al. (1990) Plant Mol. Biol. 7:171-176); сульфонамідів (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15:127-136); бромоксинілу (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423); гліфосату (Shaw et al. (1986) Science 233:478-481; і патенти США №№ 7709702 та 7462481); фосфінотрицину (DeBlock et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518). Див. загалом Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3: 506-511; Christopherson et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314-6318; Yao et al. (1992) Cell 71: 63-72; Reznikoff (1992) Mol. Microbiol. 6: 2419-2422; Barkley et al. (1980) у The Operon, pp. 177-220; Hu et al. (1987) Cell 48: 555-566; Brown et al. (1987) Cell 49: 603-612; Figge et al. (1988) Cell 52: 713-722; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5400-5404; Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2549-2553; Deuschle et al. (1990) Science 248: 480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 3343-3356; Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3952-3956; Baim et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5072-5076; Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10: 143-162; Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36: 913-919; Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin) та Gill et al. (1988) Nature 334: 721-724. Такі розкриття включені в даний документ за допомогою посилання.

35 Вищенаведений перелік генів селективних маркерів не призначений для обмеження. Будь-який ген селективного маркера можна застосовувати у варіантах здійснення.

Способи згідно з варіантами здійснення включають введення поліпептиду або полінуклеотиду в рослину. Передбачається, що "введення" означає надання рослині полінуклеотиду або поліпептиду таким чином, що послідовність потрапляє всередину клітини рослини. Способи згідно з варіантами здійснення не залежать від конкретного способу введення полінуклеотиду або поліпептиду в рослину, потрібно тільки, щоб полінуклеотид або поліпептиди потрапляли всередину щонайменше однієї клітини рослини. З рівня техніки відомі способи введення полінуклеотиду або поліпептидів у рослини, включаючи без обмеження способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та способи трансформації, опосередкованої вірусами.

45 Передбачається, що "стабільна трансформація" означає, що нуклеотидна конструкція, що введена в рослину, інтегрується в геном рослини та може успадковуватися її потомством. Передбачається, що "тимчасова трансформація" означає, що полінуклеотид вводиться в рослину та не інтегрується в геном рослини, або в рослину вводиться поліпептид.

50 Протоколи трансформації, а також протоколи для введення нуклеотидних послідовностей в рослини можна змінювати залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто однодольної або дводольної рослини, що призначена для трансформації. Придатні способи введення нуклеотидних послідовностей в рослинні клітини та подальшої вставки в геном рослини включають мікроін'єкцію (Crossway et al. (1986) Biotechniques 4: 320-334), електропорацію (Riggs et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5602-5606), Agrobacterium-опосередковану трансформацію (патенти США №№ 5563055 та 5981840), пряме перенесення генів (Paszkowski et al. (1984) EMBO J. 3: 2717-2722) та балістичне прискорення частинок (див., наприклад, патенти США №№ 4945050; 5879918; 5886244 та 5932782; Tomes et al. (1995) в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); та McCabe et al. (1988) Biotechnology 6: 923-926); а також трансформацію за допомогою

Lecl (WO 00/28058). Стосовно трансформації картоплі див. Tu et al. (1998) *Plant Molecular Biology* 37: 829-838 та Chong et al. (2000) *Transgenic Research* 9: 71-78. Додаткові методики трансформації можна знайти у Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (цибуля); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (соя); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (соя); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (соя); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (рис); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (маїс); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (маїс); у патентах США №№ 5240855; 5322783 та 5324646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (маїс); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (маїс); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; в патенті США № 5736369 (зернові); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) у *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пилок); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 та Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (опосередкована ниткоподібними кристалами трансформація); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (електропорація); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 та Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (трансформація маїсу за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*); всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання.

У конкретних варіантах здійснення послідовності згідно з варіантами здійснення можна надавати рослині із застосуванням ряду способів тимчасової трансформації. Такі способи тимчасової трансформації включають без обмеження введення білка Сгу-токсину або його варіантів та фрагментів безпосередньо в рослину або введення транскрипту Сгу-токсину в рослину. Такі способи включають, наприклад, мікроін'єкцію або бомбардування частинками. Див., наприклад, Crossway et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202: 179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44: 53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180 та Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107: 775-784, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання. Альтернативно рослину можна тимчасово трансформувати полінуклеотидом Сгу-токсину із застосуванням методик, відомих із рівня техніки. Такі методики включають застосування вірусної векторної системи та осадження полінуклеотиду в такий спосіб, який виключає подальше вивільнення ДНК. Таким чином, може відбуватися транскрипція ДНК, пов'язаної з частинками, але частота, з якою вона вивільняється для інтеграції в геном, значною мірою знижена. Такі способи включають у себе застосування частинок, вкритих поліетиленіміном (PEI; № за кат. Sigma P3143).

З рівня техніки відомі способи націленої вставки полінуклеотиду в специфічне місце розташування в геномі рослини. В одному варіанті здійснення вставку полінуклеотиду в необхідне місце розташування в геномі здійснюють із застосуванням системи сайт-специфічної рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 та WO99/25853, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання. Коротко, полінуклеотид згідно з варіантами здійснення може міститися в касеті для перенесення, фланкованій двома неідентичними сайтами рекомбінації. Касету для перенесення вводять у рослину, яка має в своєму геномі стабільно вбудований цільовий сайт, фланкований двома неідентичними сайтами рекомбінації, які відповідають сайтам касети для перенесення. Забезпечують придатну рекомбіназу, та касета для перенесення інтегрується в цільовий сайт. Полінуклеотид, який становить інтерес, таким чином, інтегрується у конкретне хромосомне положення в геномі рослини.

З клітин, які були трансформовані, можна вирощувати рослини згідно з традиційними способами. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Ці рослини потім можна вирощувати та або запилювати з використанням такої ж трансформованої лінії або інших ліній та ідентифікувати одержаний гібрид із конститутивною або індукованою експресією необхідної фенотипічної характеристики. Можна виростити два або більше поколінь для того, щоб переконатися у тому, що експресія необхідної фенотипічної характеристики стабільно підтримується та успадковується, а потім зібрати насіння, щоб переконатися у тому, що експресія необхідної фенотипічної характеристики була досягнута.

Нуклеотидні послідовності згідно з варіантами здійснення можна забезпечити в рослині за допомогою контакту рослини з вірусом або вірусними нуклеїновими кислотами. Зазвичай такі способи передбачають вбудовування нуклеотидної конструкції, що становить інтерес, у вірусну молекулу ДНК або РНК. Зрозуміло, що рекомбінантні білки згідно з варіантами здійснення можуть попередньо синтезуватися як частина вірусного поліпротеїну, який пізніше може процесуватися шляхом протеолізу *in vivo* або *in vitro* з утворенням необхідного пестицидного

білка. Також зрозуміло, що такий вірусний поліпротеїн, який містить щонайменше частину амінокислотної послідовності пестицидного білка згідно з варіантами здійснення, може мати необхідну пестицидну активність. Такі вірусні поліпротеїни та нуклеотидні послідовності, які їх кодують, охоплені варіантами здійснення. Способи забезпечення рослин нуклеотидними

5 конструкціями та одержання білків, що кодуються, у рослинах, які включають вірусні молекули ДНК або РНК, відомі з рівня техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5889191; 5889190; 5866785; 5589367 та 5316931; включені в даний документ за допомогою посилання.

Варіанти здійснення додатково відносяться до матеріалу для розмноження трансформованої рослини згідно з варіантами здійснення, у тому числі без обмеження насіння,

10 бульб, бульбоцибулин, цибулин, листя та живців коренів та пагонів.

Варіанти здійснення можна застосовувати для трансформації будь-яких видів рослин, включаючи без обмеження однодольні та дводольні. Приклади рослин, які становлять інтерес, включають без обмеження кукурудзу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), зокрема ті види *Brassica*, які є придатними як джерела олії із насіння, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (наприклад, пенісетум рогозовидний (*Pennisetum glaucum*), просо посівне (*Panicum miliaceum*), щетинник італійський (*Setaria italica*), просо пальчасте (*Eleusine coracana*)), соняшник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницю (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), тютюн (*Nicotiana tabacum*), картоплю (*Solanum tuberosum*), різновиди арахісу (*Arachis hypogaea*), бавовник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), маніок (*Manihot esculenta*), кавове дерево (*Coffea* spp.), кокосову пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусові дерева (*Citrus* spp.), шоколадне дерево (*Theobroma cacao*), чайний кущ (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), інжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливу (*Olea europaea*), папаю (*Carica papaya*), кеш'ю (*Anacardium occidentale*), макадамію (*Macadamia integrifolia*), мигдаль (*Prunus amygdalus*), різновиди цукрового буряка (*Beta vulgaris*), цукрову тростину (*Saccharum* spp.), різновиди вівса, ячмінь, овочі, декоративні рослини та хвойні рослини.

Овочі включають різновиди томата (*Lycopersicon esculentum*), латук (наприклад, *Lactuca sativa*), різновиди зеленої квасолі (*Phaseolus vulgaris*), різновиди лімської квасолі (*Phaseolus limensis*), різновиди гороху (*Lathyrus* spp.) та представників роду *Cucumis*, таких як огірок (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) та диня мускусна (*C. melo*). Декоративні рослини включають азалію (*Rhododendron* spp.), гортензію (*Macrophylla hydrangea*), гібіскус (*Hibiscus rosasanensis*), троянди (*Rosa* spp.), тюльпани (*Tulipa* spp.), нарциси (*Narcissus* spp.), петунії (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансетію (*Euphorbia pulcherrima*) та хризантему. Хвойні, які можуть бути використані при здійсненні на практиці варіантів здійснення, включають, наприклад, види сосни, такі як сосна ладанна (*Pinus taeda*), сосна Еліота (*Pinus elliotii*), сосна жовта (*Pinus ponderosa*), сосна скручена (*Pinus contorta*) та сосна промениста (*Pinus radiata*); псевдотсуга Мензиса (*Pseudotsuga menziesii*); тсуга західна (*Tsuga canadensis*); ялина сиза (*Picea glauca*); каліфорнійське мамонтове дерево (*Sequoia sempervirens*); справжні ялини, такі як ялиця біла (*Abies amabilis*) та ялиця бальзамічна (*Abies balsamea*); та кедри, такі як туя (*Thuja plicata*) та жовтий кедр (*Chamaecyparis nootkatensis*). Рослини згідно з варіантами здійснення включають культурні рослини, у тому числі без обмеження кукурудзу, люцерну, соняшник, *Brassica* spp., сою, бавовник, сафлор, арахіс, сорго, пшеницю, просо, тютюн, цукрову тростину тощо.

Різновиди газонної трави включають без обмеження: тонконіг однорічний (*Poa annua*); райгас однорічний (*Lolium multiflorum*); тонконіг стисний (*Poa compressa*); вівсяницю червону змінену (*Festuca rubra*); мітлицю тонку (*Agrostis tenuis*); мітлицю болотяну (*Agrostis palustris*); житняк пустельний (*Agropyron desertorum*); житняк гребінчастий (*Agropyron cristatum*); кострицю довголисту (*Festuca longifolia*); тонконіг лучний (*Poa pratensis*); грястицю збірну (*Dactylis glomerata*); пажитницю багаторічну (*Lolium perenne*); кострицю червону (*Festuca rubra*); мітлицю білу (*Agrostis alba*); тонконіг звичайний (*Poa trivialis*); кострицю овечу (*Festuca ovina*); стоколос безостий (*Bromus inermis*); кострицю очеретяну (*Festuca arundinacea*); тимофіївку лучну (*Phleum pratense*); мітлицю собачу (*Agrostis canina*); покісницю розставлену (*Puccinellia distans*); пирій Сміта (*Agropyron smithii*); свинорій (*Cynodon* spp.); августинову траву (*Stenotaphrum secundatum*); зойсію (*Zoysia* spp.); гречку помітну (*Paspalum notatum*); аксонопус афінський (*Axonopus affinis*); еремохлою зміхвосту (*Eremochloa ophiuroides*); кийкою (*Pennisetum clandestinum*); паспалум піхвовий (*Paspalum vaginatum*); москітний злак (*Bouteloua gracilis*); бізоніву траву (*Buchloe dactyloids*); граму (*Bouteloua curtipendula*).

60 Рослини, які становлять інтерес, включають зернові рослини, які дають насіння, яке

становлять інтерес, олійні рослини та бобові рослини. Насіння, яке становить інтерес, включає насіння зернових культур, таких як кукурудза, пшениця, ячмінь, рис, сорго, жито, просо тощо. Олійні рослини включають бавовник, сою, сафлор, соняшник, Brassica, маїс, люцерну, пальму, кокосову пальму, льон, рицину, оливу тощо. Бобові рослини включають різновиди бобів та різновиди гороху. Різновиди бобів включають гуар, ріжкове дерево, гуньбу, сою, різновиди квасолі звичайної, вігну китайську, золотисту квасоллю, лімську квасоллю, стручкову квасоллю, різновиди сочевиці, турецький горох тощо.

У певних варіантах здійснення послідовності нуклеїнових кислот згідно з варіантами здійснення можна пакетувати з будь-якою комбінацією послідовностей полінуклеотидів, що становлять інтерес, для створення рослин із необхідним фенотипом. Наприклад, полінуклеотида згідно з варіантами здійснення можна пакетувати з будь-якими іншими полінуклеотидами, які кодують поліпептиди з пестицидною та/або інсектицидною активністю, такими як інші токсичні білки Bt (описані в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5736514; 5723756; 5593881 та Geiser et al. (1986) Gene 48:109), пентин (описаний у патенті США № 5981722) тощо. Одержані комбінації також можуть включати декілька копій будь-якого полінуклеотиду, який становить інтерес. Полінуклеотида згідно з варіантами здійснення можна також пакетувати з будь-яким іншим геном або комбінацією генів для одержання рослин із різноманітними комбінаціями необхідних ознак, в тому числі без обмеження з ознаками, бажаними для використання для харчування тварин, такими як гени, які зумовлюють високий вміст олії (наприклад, патент США № 6232529); збалансований вміст амінокислот (наприклад, хордотіоніни (патенти США №№ 5990389; 5885801; 5885802 та 5703049); ячмінь із високим вмістом лізину (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165: 99-106 та документ WO 98/20122) та білки з високим вмістом метіоніну (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6279; Kirihara et al. (1988) Gene 71: 359 та Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 123)); підвищену засвоюваність (наприклад, модифіковані запасні білки (патент США № 6858778) та гени тіоредоксинів (патент США № 7009087), розкриття яких включені в даний документ за допомогою посилання.

Полінуклеотида згідно з варіантами здійснення також можна пакетувати з ознаками, бажаними для стійкості до захворювань або гербіцидів (наприклад, гени детоксикації фумонізину (патент США № 5792931); гени авірулентності та стійкості до захворювань (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262: 1432 та Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); мутанти за ацетолактат-синтазою (ALS), які призводять до стійкості до гербіцидів, як, наприклад, мутації S4 та/або Hra; стійкості до інгібіторів глутамінсинтази, таких як фосфінотрицин або basta (наприклад, ген bar); та такі, що зумовлюють стійкість до гліфосату (ген EPSPS та ген GAT, які розкриті в патентах США №№ 7709702 та 7462481; та з ознаками, бажаними для обробки або переробки продуктів, як, наприклад, високий вміст олії (наприклад, патент США № 6232529); модифіковані олії (наприклад, гени десатурази жирних кислот (патент США № 5952544; WO 94/11516)); модифіковані крохмалі (наприклад, ADPG-пірофосфорілази (AGPaза), крохмаль-синтази (SS), крохмаль-розгалуджувальні ферменти (SBE) та крохмаль-дерозгалуджувальні ферменти (SDBE)); та з полімерами або біопластмасами (наприклад, патент США № 5602321; бета-кетотіолаза, полігідроксибутиратсинтаза та ацетоацетил-CoA-редуктаза (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 5837-5847), з ознаками, що сприяють експресії полігідроксиалканоатів (PHA)), розкриття яких включені в даний документ за допомогою посилання. Також можна комбінувати полінуклеотида згідно з варіантами здійснення з полінуклеотидами, які забезпечують агрономічні ознаки, такі як чоловіча стерильність (наприклад, див. патент США № 5583210), міцність стебла, час цвітіння, або ознаки, пов'язані з технологією трансформації, такі як регуляція клітинного циклу або цілеспрямований вплив на гени (наприклад, документи WO 99/61619; WO 00/17364; WO 99/25821), розкриття яких включені в даний документ за допомогою посилання.

У деяких варіантах здійснення пакетована ознака може являти собою ознаку або трансгенний об'єкт, який одержав дозвіл контролюючих органів, у тому числі без обмеження є трансгенним об'єктом із таблиці 4A-F.

Соя Glycine max L.

Об'єкт	Компанія	Опис
A2704-12, A2704-21, A5547-35	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Соя з переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержана за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), з ґрунтової бактерії <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
A5547-127	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Соя з переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержана за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), з ґрунтової бактерії <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
BPS-CV127-9	BASF Inc.	Введений ген <i>csg1-2</i> з <i>Arabidopsis thaliana</i> кодує білок синтазу ацетогідроксикислот, який забезпечує переносимість імідазолінонових гербіцидів унаслідок точкової мутації, яка приводить до заміни однієї амінокислоти, при якій залишок серину в положенні 653 заміщений аспарагіном (S653N).
DP-305423	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Соя з високим вмістом олеїнової кислоти, одержана за допомогою вставки додаткових копій частини гена, що кодує омега-6-десатуразу, <i>gm-fad2-1</i> , що приводить до сайленсингу гена ендогенної омега-6-десатурази (FAD2-1).
DP356043	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Трансгенний об'єкт сої з двома генами переносимості гербіцидів: геном гліфосат-N-ацетилтрансферази, яка нейтралізує гліфосат, та геном модифікованої ацетолактатсинтази (ALS), яка є не сприйнятливою до ALS-інгібуючих гербіцидів.
G94-1, G94-19, G168	DuPont Canada Agricultural Products	Соя з високим вмістом олеїнової кислоти, одержана за допомогою вставки другої копії гена, що кодує десатуразу жирної кислоти (GmFad2-1), із сої, що приводить до "сайленсингу" ендогенного гена хазяїна.
GTS 40-3-2	Monsanto Company	Сорт сої з переносимістю гліфосату, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), із ґрунтової бактерії <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
GU262	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Соя з переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержана за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), з ґрунтової бактерії <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
MON87701	Monsanto Company	Стійкість до лускокрилих шкідників сої, у тому числі до гусені оксамитових бобів (<i>Anticarsia gemmatalis</i>) та соєвої совки (<i>Pseudoplusia includens</i>).
MON87701 x MON89788	Monsanto Company	Переносимість гербіциду гліфосату завдяки експресії гена, що кодує EPSPS, зі штаму CP4 A. <i>tumefaciens</i> та стійкість до лускокрилих шкідників сої, у тому числі до гусені оксамитових бобів (<i>Anticarsia gemmatalis</i>) та соєвої совки (<i>Pseudoplusia includens</i>) завдяки експресії гена, що кодує Cry1Ac, з <i>B. thuringiensis</i> .
MON89788	Monsanto Company	Соя з переносимістю гліфосату, одержана за допомогою вставки гена <i>agoA</i> (<i>epsps</i>), що кодує модифіковану 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), з <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4.

Со́я *Glycine max* L.

Об'єкт	Компанія	Опис
OT96-15	Agriculture & Agri-Food Canada	Со́я з низьким вмістом ліноленової кислоти, одержана завдяки традиційному кросбридингу, для введення нової ознаки, зумовленої мутантом гена <i>fan1</i> , що зустрічається в природних умовах, який відбирали щодо низького вмісту ліноленової кислоти.
W62, W98	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Со́я з переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержана за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), з ґрунтової бактерії <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .

Пшени́ця *Triticum aestivum*

Об'єкт	Компанія	Опис
AP205CL	BASF Inc.	Відбір щодо підданої мутагенезу версії ферменту синтази ацетогідроксикислот (AHAS), також відомої як ацетолактатсинтаза (ALS) або ацетолактат-піруват-ліаза.
AP602CL	BASF Inc.	Відбір щодо підданої мутагенезу версії ферменту синтази ацетогідроксикислот (AHAS), також відомої як ацетолактатсинтаза (ALS) або ацетолактат-піруват-ліаза.
BW255-2, BW238-3	BASF Inc.	Відбір щодо підданої мутагенезу версії ферменту синтази ацетогідроксикислот (AHAS), також відомої як ацетолактатсинтаза (ALS) або ацетолактат-піруват-ліаза.
BW7	BASF Inc.	Переносимість імідазолінонових гербіцидів, індукована за допомогою хімічного мутагенезу гена синтази ацетогідроксикислот (AHAS) із застосуванням азиду натрію.
MON71800	Monsanto Company	Сорт пшениці з переносимістю гліфосату, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), з ґрунтової бактерії <i>Agrobacterium tumefaciens</i> штаму CP4.
SWP965001	Cyanamid Crop Protection	Відбір щодо підданої мутагенезу версії ферменту синтази ацетогідроксикислот (AHAS), також відомої як ацетолактатсинтаза (ALS) або ацетолактат-піруват-ліаза.
Teal 11A	BASF Inc.	Відбір щодо підданої мутагенезу версії ферменту синтази ацетогідроксикислот (AHAS), також відомої як ацетолактатсинтаза (ALS) або ацетолактат-піруват-ліаза.

Ма́їс *Zea mays* L.

Об'єкт	Компанія	Опис
176	Syngenta Seeds, Inc.	Ма́їс зі стійкістю до комах, одержаний за допомогою вставки гена <i>Cry1Ab</i> з <i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. <i>kurstaki</i> . Генетична модифікація надає стійкості до нападу вогнівки кукурудзяної (ЕСВ).
3751IR	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Відбір соматональних варіантів шляхом культивування зародків на середовищі, яке містить імідазолінон.

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
676, 678, 680	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Maїс із чоловічою стерильністю та переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержаний за допомогою вставки генів, що кодують ДНК-аденін-метилазу та фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) з <i>Escherichia coli</i> та <i>Streptomyces viridochromogenes</i> відповідно.
B16 (DLL25)	Dekalb Genetics Corporation	Maїс із переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), зі <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
BT11 (X4334CBR, X4734CBR)	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс зі стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою вставки гена Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. <i>kurstaki</i> , та гена, що кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT), з <i>S. viridochromogenes</i> .
BT11 x GA21	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній BT11 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-BT011-1) та GA21 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00021-9).
BT11 x MIR162	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній BT11 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-BT011-1) та MIR162 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-IR162-4). Стійкість до вогнівки кукурудзяної та переносимість гербіциду глүфосинату амонію (Liberty) одержують від BT11, яка містить ген Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> та ген, який кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT), із <i>S. viridochromogenes</i> . Стійкість до інших лускокрилих шкідників, у тому числі <i>H. zea</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>A. ipsilon</i> та <i>S. albicosta</i> , одержують від MIR162, яка містить ген <i>vip3Aa</i> зі штаму AB88 <i>Bacillus thuringiensis</i> .
BT11 x MIR162 x MIR604 x GA21	Syngenta Seeds, Inc.	Стійкість до твердокрилих шкідників, зокрема до шкідників кукурудзяних жуків (<i>Diabrotica</i> spp.) та до деяких лускокрилих шкідників кукурудзи, у тому числі до вогнівки кукурудзяної (ECB, <i>Ostrinia nubilalis</i>), бавовняної совки (CEW, <i>Helicoverpa zea</i>), кукурудзяної листової совки (FAW, <i>Spodoptera frugiperda</i>) та совки-іпсилон (BCW, <i>Agrotis ipsilon</i>); переносимість гербіцидів, які містять гліфосат та глүфосинат-амонію.
BT11 x MIR604	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній BT11 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-BT011-1) та MIR604 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-IR605-5). Стійкість до вогнівки кукурудзяної та переносимість гербіциду глүфосинату амонію (Liberty) одержують від BT11, яка містить ген Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> та ген, який кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT), із <i>S. viridochromogenes</i> . Стійкість до кукурудзяного жука одержують від MIR604, яка містить ген <i>mCry3A</i> з <i>Bacillus thuringiensis</i> .

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
BT11 x MIR604 x GA21	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній BT11 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-BT011-1), MIR604 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-IR605-5) та GA21 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00021-9). Стійкість до вогнівки кукурудзяної та переносимість гербіциду глүфосинату амонію (Liberty) одержують від BT11, яка містить ген Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kurstaki та ген, який кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT), із <i>S. viridochromogenes</i> . Стійкість до кукурудзяного жука одержують від MIR604, яка містить ген mCry3A з <i>Bacillus thuringiensis</i> . Переносимість гербіциду глүфосату одержують від GA21, яка містить ген модифікованої EPSPS з маїсу.
CBH-351	Aventis CropScience	Maїс зі стійкістю до комах та переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, розроблений за допомогою вставки генів, які кодуєть білок Cry9C, з <i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. <i>tolworthi</i> , та фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) із <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
DAS-06275-8	DOW AgroSciences LLC	Maїс зі стійкістю до лускокрилих комах та переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, одержаний шляхом вставки гена Cry1F з <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>aizawai</i> та фосфінотрицин-ацетилтрансферази (PAT) зі <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC та Pioneer Hi-Bred International Inc.	Maїс зі стійкістю до кукурудзяного жука, одержаний за допомогою вставки генів Cry34Ab1 та Cry35Ab1 зі штаму PS149B1 <i>Bacillus thuringiensis</i> . Ген, який кодує PAT, зі <i>Streptomyces viridochromogenes</i> вводили як селективний маркер.
DAS-59122-7 x NK603	DOW AgroSciences LLC та Pioneer Hi-Bred International Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній DAS-59122-7 (унікальний ідентифікатор OECD: DAS-59122-7) з NK603 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00603-6). Стійкість до кукурудзяного жука одержують від DAS-59122-7, яка містить гени Cry34Ab1 та Cry35Ab1 зі штаму PS149B1 <i>Bacillus thuringiensis</i> . Переносимість гербіциду глүфосату одержують від NK603.
DAS-59122-7 x TC1507 x NK603	DOW AgroSciences LLC та Pioneer Hi-Bred International Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній DAS-59122-7 (унікальний ідентифікатор OECD: DAS-59122-7) та TC1507 (унікальний ідентифікатор OECD: DAS-01507-1) з NK603 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00603-6). Стійкість до кукурудзяного жука одержують від DAS-59122-7, яка містить гени Cry34Ab1 та Cry35Ab1 зі штаму PS149B1 <i>Bacillus thuringiensis</i> . Стійкість до лускокрилих та переносимість гербіциду глүфосинату амонію одержують від TC1507. Переносимість гербіциду глүфосату одержують від NK603.

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
DBT418	Dekalb Genetics Corporation	Maїс зі стійкістю до комах та переносимістю гербіциду глүфосинату амонію, розроблений за допомогою вставки генів, які кодують білок Cry1AC з <i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. <i>kurstaki</i> , та фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) із <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
DK404SR	BASF Inc.	Сомаклональні варіанти з модифікованою ацетил-СоА-карбоксилазою (АССазою) відбирали за допомогою культивування зародків на середовищі, збагаченому сетоксидимом.
Трансгенний об'єкт 3272	Syngenta Seeds, Inc.	Лінія маїсу, яка експресує ген термостабільної альфа-амілази ату797Е для застосування у способі одержання етанолу із застосуванням сухого помелу. Ген фосфоманозо-ізомерази від <i>E.coli</i> застосовували як селективний маркер.
Трансгенний об'єкт 98140	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Трансгенний об'єкт маїсу, який експресує переносимість гербіциду гліфосату, шляхом експресії модифікованої бактеріальної гліфосат-N-ацетилтрансферази та ALS-інгібуючих гербіцидів, шляхом експресії модифікованої форми ферменту ацетолактатсинтази маїсу.
EXP1910IT	Syngenta Seeds, Inc. (у минулому Zeneca Seeds)	Переносимість імідазолінонового гербіциду, імазетапіру, індукована хімічним мутагенезом ферменту ацетолактатсинтази (ALS) із застосуванням етилметансульфонату (EMS).
GA21	Syngenta Seeds, Inc. (у минулому Zeneca Seeds)	Введення за допомогою бомбардування частинками модифікованої 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS), ферменту, залученого у біохімічний метаболічний шлях шикімату, для одержання ароматичних амінокислот.
GA21 x MON810	Monsanto Company	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній GA21 (ідентифікатор OECD: MON-00021-9) та MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6).
IT	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Переносимість імідазолінонового гербіциду, імазетапіру одержували за допомогою відбору <i>in vitro</i> сомаклональних варіантів.
LY038	Monsanto Company	Змінений амінокислотний склад, специфічно підвищені рівні лізину завдяки введенню гена <i>cordarA</i> , одержаного від <i>Corynebacterium glutamicum</i> , що кодує фермент дигідродіпіколінат-синтазу (сDHDPS).
MIR162	Syngenta Seeds, Inc.	Трансгенний об'єкт маїсу зі стійкістю до комах, який експресує білок Vip3A з <i>Bacillus thuringiensis</i> та селективний маркер PMI з <i>Escherichia coli</i> .
MIR604	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс зі стійкістю до кукурудзяного жука, одержаний шляхом трансформації модифікованим геном Cry3A. Ген фосфоманозо-ізомерази від <i>E.coli</i> застосовували як селективний маркер.
MIR604 x GA21	Syngenta Seeds, Inc.	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній MIR604 (унікальний ідентифікатор OECD: SYN-IR605-5) та GA21 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00021-9). Стійкість до кукурудзяного жука одержують від MIR604, яка містить ген <i>mCry3A</i> з <i>Bacillus thuringiensis</i> . Переносимість гербіциду гліфосату одержують від GA21.

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
MON80100	Monsanto Company	Maїс зі стійкістю до комах, одержаний за допомогою вставки гена Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. <i>kurstaki</i> . Генетична модифікація надає стійкості до нападу вогнівки кукурудзяної (ЕСВ).
MON802	Monsanto Company	Maїс зі стійкістю до комах та переносимістю гербіциду гліфосату, одержаний за допомогою вставки генів, які кодують білок Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> та 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) зі штаму CP4 A. <i>tumefaciens</i> .
MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Стійкість до вогнівки кукурудзяної (<i>Ostrinia nubilalis</i>) за допомогою введення синтетичного гена Cry1Ab. Стійкість до гліфосату за допомогою введення бактеріальної версії рослинного ферменту, 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS).
MON810	Monsanto Company	Maїс зі стійкістю до комах, одержаний за допомогою вставки усіченої форми гена Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1. Генетична модифікація надає стійкості до нападу вогнівки кукурудзяної (ЕСВ).
MON810 x LY038	Monsanto Company	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та збільшеним умістом лізину, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6) та LY038 (ідентифікатор OECD: REN-00038-3).
MON810 x MON88017	Monsanto Company	Maїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гліфосату, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6) та MON88017 (ідентифікатор OECD: MON-88017-3). Стійкість до вогнівки кукурудзяної (ЕСВ) одержана завдяки усіченій формі гена Cry1Ab з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1, присутнього в MON810. Стійкість до кукурудзяного жука одержують завдяки гену Cry3Bb1 зі штаму EG4691 <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kumamotoensis</i> , присутньому в MON88017. Переносимість гліфосату одержують завдяки гену, який кодує 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), зі штаму CP4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , присутньому в MON88017.
MON832	Monsanto Company	Введення за допомогою бомбардування частинками гліфосатоксидази (GOX) та модифікованої 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS), ферменту, залученого у біохімічний метаболічний шлях шикімату, для одержання ароматичних амінокислот.
MON863	Monsanto Company	Maїс зі стійкістю до кукурудзяного жука, одержаний за допомогою вставки гена Cry3Bb1 з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .
MON863 x MON810	Monsanto Company	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній MON863 (ідентифікатор OECD: MON-00863-5) та MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6)
MON863 x MON810 x NK603	Monsanto Company	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу гібриду з пакетованими генами MON-00863-5 x MON-00810-6 та NK603 (ідентифікатор OECD: MON-00603-6).

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
MON863 x NK603	Monsanto Company	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній MON863 (ідентифікатор OECD: MON-00863-5) та NK603 (ідентифікатор OECD: MON-00603-6).
MON87460	Monsanto Company	MON 87460 розробляли для забезпечення зниження втрати врожаю в умовах обмеженої кількості води щодо традиційного маїсу. Ефективність щодо MON 87460 одержують за допомогою експресії вставленого білка холододового шоку B (CspB) <i>Bacillus subtilis</i> .
MON88017	Monsanto Company	Маїс зі стійкістю до кукурудзяного жука, одержаний за допомогою вставки гена Cry3Bb1 зі штаму EG4691 з <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> . Переносимість гліфосату одержують за допомогою вставки гена, що кодує 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), зі штаму CP4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
MON89034	Monsanto Company	Трансгенний об'єкт маїсу, який експресує два різні інсектицидні білки з <i>Bacillus thuringiensis</i> , що забезпечує стійкість до ряду лускокрилих шкідників.
MON89034 x MON88017	Monsanto Company	Маїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гліфосату, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній MON89034 (ідентифікатор OECD: MON-89034-3) та MON88017 (ідентифікатор OECD: MON-88017-3). Стійкість до лускокрилих комах одержують завдяки двом генам Cry, присутнім у MON89034. Стійкість до кукурудзяного жука одержують завдяки одному гену Cry та переносимість гліфосату одержують завдяки гену, який кодує 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) з <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , присутньому в MON88017.
MON89034 x NK603	Monsanto Company	Маїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній MON89034 (ідентифікатор OECD: MON-89034-3) з NK603 (унікальний ідентифікатор OECD: MON-00603-6). Стійкість до лускокрилих комах одержують завдяки двом генам Cry, присутнім у MON89034. Переносимість гербіциду гліфосату одержують від NK603.
MON89034 x TC1507 x MON88017 x DAS-59122-7	Monsanto Company та Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC	Маїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній: MON89034, TC1507, MON88017 та DAS-59122. Стійкість до наземних та підземних комах-шкідників та переносимість гербіцидів гліфосату та глюфосинату амонію.
MS3	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Чоловіча стерильність, викликана експресією гена рибонуклеази барнази з <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; стійкість до PPT була присутньою завдяки PPT-ацетилтрансферазі (PAT).
MS6	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Чоловіча стерильність, викликана експресією гена рибонуклеази барнази з <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; стійкість до PPT була присутньою завдяки PPT-ацетилтрансферазі (PAT).

Maїс Zea mays L.

Об'єкт	Компанія	Опис
NK603	Monsanto Company	Введення за допомогою бомбардування частинками модифікованої 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS), ферменту, залученого у біохімічний метаболічний шлях шикімату, для одержання ароматичних амінокислот.
NK603 x MON810	Monsanto Company	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній NK603 (ідентифікатор OECD: MON-00603-6) та MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6).
NK603 x T25	Monsanto Company	Гібрид маїсу з пакетованою переносимістю гербіциду глуфосинату амонію та гліфосату, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній NK603 (ідентифікатор OECD: MON-00603-6) та T25 (ідентифікатор OECD: ACS-ZM003-2).
T14, T25	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Маїс із переносимістю гербіциду глуфосинату, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT) з <i>Streptomyces viridochromogenes</i> , що належить до аеробних актиноміцетів.
T25 x MON810	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній T25 (ідентифікатор OECD: ACS-ZM003-2) та MON810 (ідентифікатор OECD: MON-00810-6).
TC1507	Mycogen (c/o Dow AgroSciences); Pioneer (c/o DuPont)	Маїс зі стійкістю до комах та переносимістю гербіциду глуфосинату амонію, одержаний за допомогою вставки гена Cry1F з <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> та гена, що кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу, із <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
TC1507 x DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC та Pioneer Hi-Bred International Inc.	Маїс із пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний за допомогою традиційного кросбридингу батьківських ліній TC1507 (унікальний ідентифікатор OECD: DAS-O1507-1) з DAS-59122-7 (унікальний ідентифікатор OECD: DAS-59122-7). Стійкість до лускокрилих комах одержують від TC1507 унаслідок присутності гена Cry1F з <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . Стійкість до кукурудзяного жука одержують від DAS-59122-7, яка містить гени Cry34Ab1 та Cry35Ab1 зі штаму PS149B1 <i>Bacillus thuringiensis</i> . Переносимість гербіциду глуфосинату амонію одержують від TC1507 завдяки гену, який кодує фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу із <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
TC1507 x NK603	DOW AgroSciences LLC	Гібрид кукурудзи з пакетованою стійкістю до комах та переносимістю гербіцидів, одержаний у результаті традиційного кросбридингу батьківських ліній 1507 (ідентифікатор OECD: DAS-O1507-1) та NK603 (ідентифікатор OECD: MON-00603-6).

Рис *Oryza sativa*

Об'єкт	Компанія	Опис
CL121, CL141, CFX51	BASF Inc.	Переносимість імідазолінового гербіциду, імазетапіру, індукована хімічним мутагенезом ферменту ацетолактатсинтази (ALS) із застосуванням етилметансульфонату (EMS).
IMINTA-1, IMINTA-4	BASF Inc.	Переносимість імідазолінових гербіцидів, індукована хімічним мутагенезом ферменту ацетолактатсинтази (ALS) із застосуванням азиду натрію.
LLRICE06, LLRICE62	Aventis CropScience	Рис із переносимістю гербіциду глуфосинату амонію, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), із ґрунтової бактерії <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
LLRICE601	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Рис із переносимістю гербіциду глуфосинату амонію, одержаний за допомогою вставки гена, що кодує модифіковану фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), із ґрунтової бактерії <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
PWC16	BASF Inc.	Переносимість імідазолінового гербіциду, імазетапіру, індукована хімічним мутагенезом ферменту ацетолактатсинтази (ALS) із застосуванням етилметансульфонату (EMS).

Таблиця 4E

Соняшник *Helianthus annuus*

Об'єкт	Компанія	Опис
X81359	BASF Inc.	Переносимість імідазолінових гербіцидів за допомогою відбору мутанта, що зустрічається в природних умовах.

Таблиця 4F

Люцерна *Medicago sativa*

Об'єкт	Компанія	Опис
J101, J163	Monsanto Company та Forage Genetics International	Люцерна (люцерна посівна) з переносимістю гербіциду гліфосату, одержана за допомогою вставки гена, що кодує фермент 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) зі штаму CP4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

5 Інші трансгенні об'єкти, дозволені контролюючими органами, добре відомі фахівцю в даній галузі, та їх можна знайти на сайті Центру оцінки ризику для навколишнього середовища (seagmcs.org/?action=gm_crop_database, доступ до якого можна отримати із застосуванням префікса www) та на сайті Міжнародної служби з придбання агробіотехнологічних додатків (isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp, доступ до якого можна отримати із застосуванням префікса www).

10 Дані пакетовані комбінації можна створювати будь-яким способом, у тому числі без обмеження перехресним схрещуванням рослин за допомогою будь-якої традиційної методики, або методики TOPCROSS®, або генетичної трансформації. Якщо ознаки пакетовані за допомогою генетичної трансформації рослин, то послідовності полінуклеотидів, що становлять
15 інтерес, можна комбінувати в будь-який час та в будь-якому порядку. Наприклад, трансгенну рослину, яка містить одну або декілька необхідних ознак, можна застосовувати як мішень для введення додаткових ознак за допомогою послідовної трансформації. Ознаки можна вводити

одночасно в протоколі котрансформації з полінуклеотидами, що становлять інтерес, які представлені будь-якою комбінацією касет трансформації. Наприклад, якщо будуть вводитися дві послідовності, то ці дві послідовності можуть міститися в окремих касетах для трансформації (транс) або міститися в одній касеті для трансформації (цис). Експресія цих послідовностей може керуватися тим же самим промотором або різними промоторами. У певних випадках може потребуватися введення касети для трансформації, яка буде пригнічувати експресію полінуклеотиду, що становить інтерес. Її можна комбінувати з будь-якою комбінацією інших касет для супресії або касет для надекспресії для одержання необхідної комбінації ознак у рослині. Крім того, вважається, що полінуклеотидні послідовності можна пакетувати в необхідному місці розташування в геномі із застосуванням системи для сайт-специфічної рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 та WO99/25853, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання.

Композиції згідно з варіантами здійснення знаходять різноманітні застосування в захисті рослин, насіння та рослинних продуктів. Наприклад, композиції можна застосовувати у способі, який передбачає поміщення ефективної кількості пестицидної композиції в середовище проживання шкідника за допомогою процедури, вибраної з групи, що складається з обприскування, обпилювання, розкидання або нанесення покриття на насіння.

Перед продажем матеріалу для розмноження рослин (плода, бульби, цибулини, бульбоцибулин, зерен, насінина), особливо насінини як комерційного продукту, його в звичайному порядку обробляють з застосуванням захисного покриття, яке містить гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, молюскоциди або суміші деяких з цих препаратів, за необхідності, разом із додатковими носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними речовинами, що сприяють нанесенню, зазвичай застосовуваними в галузі отримання складів для забезпечення захисту від пошкодження, спричиненого бактеріальними, грибовими шкідниками або тваринами-шкідниками. Для того, щоб обробити насінину, захисне покриття можна застосовувати щодо насіння або шляхом просочення бульб або зерен рідким складом, або шляхом нанесення на них покриття з комбінованого вологого або сухого складу. Крім того, в особливих випадках можливі інші способи застосування щодо рослин, наприклад обробка, спрямована на бруньки або плоди.

Насінина рослини згідно з варіантами здійснення, яка містить нуклеотидну послідовність, яка кодує пестицидний білок згідно з варіантами здійснення, можна обробляти захисним покриттям для насіння, яке містить сполуку для обробки насіння, таку як, наприклад, каптан, карбоксин, тирам, металаксил, піриміфос-метил та інші, які зазвичай застосовують в обробці насіння. В одному варіанті здійснення захисне покриття для насіння, яке містить пестицидну композицію згідно з варіантами здійснення, застосовують окремо або в комбінації з одним із захисних покриттів для насіння, зазвичай застосовуваних в обробці насіння.

Вважається, що гени, які кодують пестицидні білки, можна застосовувати для трансформації організмів, патогенних для комах. Такі організми включають бакуловіруси, гриби, найпростіших, бактерій та нематод.

Ген, який кодує пестицидний білок згідно з варіантами здійснення, можна вводити за допомогою придатного вектора в мікроорганізм-хазяїна, а вказаного хазяїна застосовувати щодо навколишнього середовища, або рослин, або тварин. Термін "введений" у контексті вставки нуклеїнової кислоти в клітину означає "трансфекцію", або "трансформацію", або "трансдукцію" та включає посилання на вбудовування нуклеїнової кислоти в еукаріотичну або прокаріотичну клітину, де нуклеїнова кислота може вбудовуватися в геном клітини (наприклад, хромосому, плазмиду, пластидну або мітохондріальну ДНК), перетворюватися на автономний реплікон або тимчасово експресуватися (наприклад, трансфікована мРНК).

Можуть бути вибрані мікроорганізми-хазяїни, які, як відомо, заселяють "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу та/або ризоплан) однієї або декількох сільськогосподарських культур, які становлять інтерес. Дані мікроорганізми вибирають таким чином, щоб вони могли успішно конкурувати в конкретному середовищі з мікроорганізмами дикого типу, забезпечувати стабільне підтримання та експресію гена, який експресує пестицидний білок, та, бажано, забезпечувати поліпшений захист пестициду від руйнування та інактивації в навколишньому середовищі.

Такі мікроорганізми включають бактерії, водорості та гриби. Особливий інтерес становлять мікроорганізми, такі як бактерії, наприклад, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* та *Alcaligenes*, гриби, зокрема дріжджі, наприклад, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* та *Aureobasidium*. Особливий інтерес становлять такі види бактерій фітосфери, як *Pseudomonas*

syringae, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* та *Azotobacter vinelandii*, а також види дріжджів фітосфери, такі як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluuyveromyces veronae* та *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес становлять пігментовані мікроорганізми.

Доступний ряд способів для введення гена, який експресує пестицидний білок, в мікроорганізм-хазяїн в умовах, які створюють можливість для стабільного підтримання та експресії даного гена. Наприклад, можна конструювати касети експресії, які містять нуклеотидні конструкції, які становлять інтерес, функціонально пов'язані з сигналами регуляції транскрипції та трансляції для експресії нуклеотидних конструкцій, та нуклеотидну послідовність, гомологічну послідовності в організмі-хазяїні, за допомогою якої буде відбуватися інтеграція, та/або систему реплікації, що функціонує в хазяїні, за допомогою якої буде відбуватися інтеграція або стабільне підтримання.

Сигнали регуляції транскрипції та трансляції включають в себе без обмеження промотори, старт-сайти ініціації транскрипції, оператори, активатори, енхансери, інші регуляторні елементи, сайти зв'язування рибосом, кодон ініціації, сигнали термінації тощо. Див., наприклад, патенти США №№ 5039523 та 4853331; EPO 0480762A2; Sambrook; Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Davis et al., eds. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) та джерела, цитовані в цих документах.

Придатні клітини-хазяї, де клітини, які містять пестицидний білок, будуть обробляти для продовження активності пестицидних білків у клітині у випадку, коли оброблену клітину вносять у середовище проживання шкідника-мішені (шкідників-мішеней), можуть включати або прокариотів, або еукаріотів, при цьому вони зазвичай обмежені тими клітинами, які не виробляють речовин, токсичних для вищих організмів, таких як ссавці. Однак організми, які виробляють речовини, токсичні для вищих організмів, можна застосовувати в тому випадку, коли токсин є нестабільним або рівень застосування є досить низьким, щоб уникнути будь-якої можливості токсичності щодо ссавця-хазяїна. Як хазяї особливий інтерес будуть становити прокариоти та нижчі еукаріоти, такі як гриби. Ілюстративні прокариоти, як грамнегативні, так і грампозитивні, включають *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* та *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiaceae*, такі як *Rhizobium*; *Spirillaceae*, такі як *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, такі як *Pseudomonas* та *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* та *Nitrobacteraceae*. Серед еукаріотів представлені гриби, такі як *Phycomycetes* і *Ascomycetes*, які включають дріжджі, такі як *Saccharomyces* і *Schizosaccharomyces*; та дріжджі з відділу *Basidiomycetes*, такі як *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* тощо.

Характеристики, які становлять особливий інтерес при виборі клітини-хазяїна з метою вироблення пестицидного білка, включають простоту введення гена пестицидного білка в хазяїна, доступність систем експресії, ефективність експресії, стабільність білка в хазяїні та наявність супутніх генетичних можливостей. Характеристики, які становлять інтерес для застосування у вигляді пестицидної мікрокапсули, включають захисні властивості для пестициду, такі як товсті клітинні стінки, пігментація та внутрішньоклітинна упаковка або утворення тілець-включень; спорідненість до листя; відсутність токсичності для ссавців; привабливість для поглинання шкідниками; простота знищення та засвоєння без пошкодження токсину тощо. Інші аспекти включають легкість складання та здійснення маніпуляцій, економічність, стабільність під час зберігання тощо.

Організми-хазяї, що становлять особливий інтерес, включають дріжджі, такі як *Rhodotorula* spp., *Aureobasidium* spp., *Saccharomyces* spp. (такі як *S. cerevisiae*), *Sporobolomyces* spp., організми філоплану, такі як *Pseudomonas* spp. (такі як *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Erwinia* spp. та *Flavobacterium* spp., й інші такі організми, у тому числі *Bt*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* тощо.

Гени, що кодують пестицидні білки згідно з варіантами здійснення, можна вводити в мікроорганізми, які розмножуються на рослинах (епіфіти) для доставки пестицидних білків до потенційних шкідників-мішеней. Епіфіти, наприклад, можуть являти собою грампозитивні або грамнегативні бактерії.

Бактерії, які колонізують корені, наприклад, можна виділяти з рослин, які становлять інтерес, за допомогою способів, відомих із рівня техніки. А саме, штам *Bacillus cereus*, який колонізує корені, можна виділяти з коренів рослини (див., наприклад, Handelsman et al. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713-718). Гени, які кодують пестицидні білки згідно з варіантами

здійснення, можна вводити в *Bacillus cereus*, яка колонізує корені, за допомогою стандартних способів, відомих з рівня техніки.

Гени, які кодують пестицидні білки, можна вводити, наприклад, в *Bacillus*, яка колонізує корені, за допомогою електротрансформації. Зокрема, гени, які кодують пестицидні білки, можна клонувати в човниковий вектор, наприклад, pHT3101 (Lerecius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218). Човниковий вектор pHT3101, який містить кодуюльну послідовність конкретного гена пестицидного білка, можна, наприклад, трансформувати в *Bacillus*, яка колонізує корені, за допомогою електропорації (Lerecius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218).

Системи експресії можна розробляти таким чином, щоб пестицидні білки секретувалися за межі цитоплазми грамнегативних бактерій, таких як, наприклад, *E. coli*. Переваги секреції пестицидних білків є наступними: (1) можливість уникнути потенційних цитотоксичних ефектів експресованого пестицидного білка та (2) поліпшення ефективності очищення пестицидного білка, у тому числі без обмеження підвищення ефективності виділення та очищення білка в розрахунку на об'єм клітинного бульйону та зниження часу та/або витрат на вилучення та очищення в перерахунку на одиницю білка.

Пестицидні білки можна створювати таким чином, щоб вони секретувалися в *E. coli*, наприклад, шляхом злиття придатного сигнального пептиду *E. coli* з аміно-кінцем пестицидного білка. Сигнальні пептиди, що розпізнаються *E. coli*, можна знайти в білках, які, як вже відомо, секретуються *E. coli*, наприклад, білок OmpA (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J, 3:2437-2442). OmpA являє собою головний білок зовнішньої мембрани *E. coli*, та, таким чином, вважають, що його сигнальний пептид є ефективним у процесі транслокації. Також сигнальний пептид OmpA не потрібно модифікувати перед процесингом, як це може бути у випадку інших сигнальних пептидів, наприклад сигнального пептиду ліпопротеїнів (Duffaud et al. (1987) Meth. Enzymol. 153: 492).

Пестицидні білки згідно з варіантами здійснення можна ферментувати в бактерії-хазяїні, а отримані бактерії обробляти та застосовувати у вигляді мікробних розпилюваних розчинів тим же способом, що й штами *Bt*, які застосовували у вигляді інсектицидних розпилюваних розчинів. У випадку пестицидного білка(білків), які секретуються з *Bacillus*, сигнал секреції видаляють або піддають мутації із застосуванням методик, відомих із рівня техніки. Такі мутації та/або делеції попереджають секрецію пестицидного білка(білків) в середовищі для росту під час процесу ферментації. Пестицидні білки залишаються в межах клітини, та клітини потім обробляють для одержання інкапсульованих пестицидних білків. Для цієї мети можна застосовувати будь-який придатний мікроорганізм. *Pseudomonas* застосовували для експресії *Bt*-токсинів у вигляді інкапсульованих білків, а одержані клітини піддавали обробці та розпиленню як інсектицид (Gaertner et al. (1993), в: Advanced Engineered Pesticides, ed. Kim).

Альтернативно, пестицидні білки виробляються в результаті введення гетерологічного гена в клітинного хазяїна. Експресія гетерологічного гена приводить, прямо або опосередковано, до вироблення та зберігання пестициду всередині клітини. Ці клітини потім обробляють в умовах, які продовжують активність токсину, що продукується в клітині, у випадку внесення клітини в навколишнє середовище шкідника-мішені(шкідників-мішеней). Одержаний продукт зберігає токсичність токсину. Ці інкапсульовані природним чином пестицидні білки можна потім складати відповідно до традиційних методик для застосування щодо середовища проживання шкідника-мішені, наприклад, ґрунт, вода та листя рослин. Див., наприклад, документ EP0192319 та джерела, цитовані в цьому документі.

У варіантах здійснення трансформований мікроорганізм (який включає цілі організми, клітини, спору(спори), пестицидний білок(білки), пестицидний компонент(компоненти), компонент(компоненти), який здійснює вплив на шкідника, мутант(мутанти), живі або мертві клітини та клітинні компоненти, у тому числі суміші живих та мертвих клітин та клітинних компонентів і в тому числі зруйновані клітини та клітинні компоненти) або виділений пестицидний білок можна скласти з прийнятним носієм у пестицидну композицію(композиції), яка являє собою, наприклад, суспензію, розчин, емульсію, розпилюваний порошок, дисперговані гранули або пелети, змочуваний порошок та концентрат, що емульгується, аерозоль або розпилюваний розчин, просочені гранули, допоміжний засіб, пасту, яку наносять як покриття, колоїд, а також інкапсульовані форми, наприклад, у полімерних речовинах. Такі складені композиції можна одержувати за допомогою таких загальноприйнятих способів, як висушування, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрування, центрифугування, седиментація або концентрування культури клітин, що містять поліпептид.

Такі композиції, розкриті вище, можна одержувати за допомогою додавання поверхнево-активного засобу, інертного носія, консерванта, зволожувача, стимулятора харчування,

атрактанта, засобу для інкапсуляції, зв'язувальної речовини, емульгатора, барвника, захисного засобу від УФ, буфера, засобу, що підвищує плінність, або добрив, донорів поживних мікроелементів або інших препаратів, які впливають на ріст рослини. Один або декілька агрохімікатів, у тому числі без обмеження гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, моллюскоциди, акарициди, регулятори росту рослин, допоміжні засоби для збору врожаю та добрива можна комбінувати з носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними засобами, традиційно застосовуваними в галузі складання, або іншими компонентами для полегшення здійснення маніпуляцій з продуктом та його застосування щодо конкретних шкідників-мішеней. Придатні носії та допоміжні засоби можуть бути твердими або рідкими та відповідають речовинам, які зазвичай використовують у технології складання, наприклад природним або регенованим мінеральним речовинам, розчинникам, диспергуючим речовинам, змочувальним засобам, речовинам, які надають клейкість, зв'язувальним речовинам або добривам. Активні інгредієнти згідно з варіантами здійснення зазвичай застосовують у вигляді композицій та їх можна застосовувати щодо оброблюваної площі, рослини або насіння, які підлягають обробці. Наприклад, композиції відповідно до варіантів здійснення можна застосовувати щодо зерна при підготовці до зберігання або під час зберігання у зерновому бункері або елеваторі тощо. Композиції згідно з варіантами здійснення можна застосовувати одночасно або послідовно з іншими сполуками. Способи застосування активного інгредієнта відповідно до варіантів здійснення або агрохімічної композиції відповідно до варіантів здійснення, які містить щонайменше один із пестицидних білків, які виробляються штамми бактерій відповідно до варіантів здійснення, включають без обмеження позакореневе застосування, нанесення покриття на насіння та застосування щодо ґрунту. Кількість застосувань та норма застосування залежать від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Придатні поверхнево-активні засоби включають без обмеження аніонні сполуки, такі як карбоксилат, наприклад, металу; карбоксилат довголанцюгової жирної кислоти; N-ацилсаркозинат; моно- або дієстери фосфорної кислоти з етоксилатами жирних спиртів або солі таких естерів; сульфати жирних спиртів, такі як додецилсульфат натрію, октадецилсульфат натрію або цетилсульфат натрію; сульфати етоксированих жирних спиртів; етоксировані алкілфенолсульфати; лігнінсульфонати; нафтові сульфонати; алкіларилсульфонати, такі як алкіл-бензолсульфонати або нижчі алкілнафталінсульфонати, наприклад, бутілнафталінсульфонат; солі сульфонованих нафталін-формальдегідних конденсатів; солі сульфонованих фенол-формальдегідних конденсатів; більш складні сульфонати, наприклад, сульфонати амідів, наприклад сульфований продукт конденсації олеїнової кислоти та N-метилтаурину; або діалкілсульфосукцинати, наприклад, сульфонат натрію або діоктилсукцинат. Неіоногенні засоби включають продукти конденсації естерів жирних кислот, жирних спиртів, амідів жирних кислот або жирних алкіл- або алкенилзаміщених фенолів з етиленоксидом, естерів жирної кислоти та етерів багатоатомних спиртів, наприклад естери сорбіту та жирних кислот, продукти конденсації таких естерів з етиленоксидом, наприклад естери поліоксиетиленсорбітану та жирних кислот, блок-співполімери етиленоксиду та пропіленоксиду, ацетиленові гліколі, такі як 2,4,7,9-тетраетил-5-децин-4,7-діол, або етоксировані ацетиленові гліколі. Приклади катіонного поверхнево-активного засобу включають, наприклад, аліфатичний моно-, ди- або поліамін, такий як ацетат, нафтенат або олеат; або амін, що містить кисень, такий як аміноксид поліоксиетиленалкіламіну; аміни з амідними зв'язками, одержані шляхом конденсації карбонової кислоти з ди- або поліаміном; або сіль четвертинного амонію.

Приклади інертних матеріалів включають без обмеження неорганічні мінеральні речовини, такі як каолін, філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати, або рослинні матеріали, такі як корок, подрібнені у порошок стрижні кукурудзяних початків, луска арахісу, луска рису та лушпиння волоських горіхів.

Композиції згідно з варіантами здійснення можуть знаходитись у формі, придатній для безпосереднього застосування, або у вигляді концентрату первинної композиції, для якого необхідно розведення відповідною кількістю води або іншого розріджувача перед застосуванням. Концентрація пестициду буде варіювати залежно від природи конкретного складу, зокрема від того, чи є він концентратом або має застосовуватися безпосередньо. Композиція містить 1-98 % твердого або рідкого інертного носія та 0-50 % або 0,1-50 % поверхнево-активної речовини. Такі композиції будуть вводити з розрахунку позначеної норми для комерційного продукту, наприклад, приблизно 0,01 фунта - 5,0 фунтів на акр під час застосування в сухій формі та розрахунку приблизно 0,01 пінти - 10 пінт на акр під час застосування в рідкій формі.

У додатковому варіанті здійснення композиції, а також трансформовані мікроорганізми та

пестицидні білки згідно з варіантами здійснення можна обробляти перед складанням для подовження пестицидної активності під час застосування щодо середовища проживання шкідника-мішені за умови, що попередня обробка не здійснює шкідливий вплив на пестицидну активність. Таку обробку можна здійснювати за допомогою хімічних та/або фізичних засобів за умови, що обробка не впливає негативно на властивості композиції(композицій). Приклади хімічних реактивів включають без обмеження галогенуючі засоби; альдегіди, такі як формальдегід та глутаровий альдегід; протиінфекційні засоби, такі як зефіран хлорид; спирти, такі як ізопропанол та етанол; та фіксуючі суміші для гістологічних препаратів, такі як фіксуюча суміш Буена та фіксуюча суміш Хеллі (див., наприклад, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (W.H. Freeman and Co.).

В інших варіантах здійснення перевагу буде мати обробка поліпептидів Cry-токсинів протеазою, наприклад трипсином, для активації білка перед застосуванням композиції з пестицидним білком згідно з варіантами здійснення щодо середовища проживання шкідника-мішені. Способи активації протоксину серинової протеазою добре відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Cooksey (1968) *Biochem. J.* 6:445-454 та Carroll and Ellar (1989) *Biochem. J.* 261:99-105, ідеї яких включені в даний документ за допомогою посилання. Наприклад, придатний протокол активації включає без обмеження об'єднання поліпептиду, який потрібно активувати, наприклад, очищеного нового Cry-поліпептиду (наприклад, з амінокислотною послідовністю, викладеною у SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10), та трипсину у ваговому співвідношенні білок/трипсин 1/100 у 20 nM NaHCO₃, при pH 8, та розщеплювання зразка при 36 °C протягом 3 годин.

Композиції (у тому числі трансформовані мікроорганізми та пестицидні білки згідно з варіантами здійснення) можна застосовувати щодо середовища проживання комахи-шкідника, наприклад, за допомогою обприскування, дрібнодисперсного розпилення, обпилювання, розкидання, нанесення покриття або поливання, введення в ґрунт або на нього, введення в поливну воду, за допомогою обробки насіння або загального застосування або обпилювання в той час, коли шкідник почав з'являтися, або перед появою шкідників як захід захисту. Наприклад, пестицидний білок та/або трансформовані мікроорганізми згідно з варіантами здійснення можна змішувати із зерном для захисту зерна під час зберігання. Загалом важливо забезпечувати добрий контроль шкідників на ранніх стадіях росту рослин, оскільки як раз у цей час рослина може пошкоджуватися найбільш сильно. Для зручності композиції згідно з варіантами здійснення можуть містити інший інсектицид, якщо це вважається необхідним. В одному варіанті здійснення композицію застосовують безпосередньо щодо ґрунту під час висаджування в гранулярній формі композиції носія та мертвих клітин штаму *Bacillus* або трансформованого мікроорганізму згідно з варіантами здійснення. Іншим варіантом здійснення є гранулярна форма композиції, яка містить агрохімікат, такий як, наприклад, гербіцид, інсектицид, добриво, інертний носій та мертві клітини штаму *Bacillus* або трансформованого мікроорганізму згідно з варіантами здійснення.

Фахівцю у даній галузі техніки буде зрозуміло, що не всі сполуки однаковою мірою ефективні проти всіх шкідників. Сполуки згідно з варіантами здійснення проявляють активність щодо комах-шкідників, які можуть включати економічно важливих агрономічних, лісових, тепличних шкідників, шкідників розплідників, декоративних рослин, їжі та тканин, здоров'я людей та тварин, домашньої та комерційної інфраструктури, домашнього господарства та продуктів, що підлягають зберіганню. Комахи-шкідники включають комах, вибраних із рядів *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermoptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* тощо, зокрема, *Coleoptera* та *Lepidoptera*.

Комахи з ряду *Lepidoptera* включають без обмеження совок, підгризаючих совок, п'ядунів і геліотин родини *Noctuidae* *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка-інсилон); *A. orthogonia* Morrison (совка прямокутна); *A. segetum* Denis & Schiffmüller (совка озима); *A. subterranea* Fabricius (совка зерниста); *Alabama argillacea* Hübner (совка бавовняна американська); *Anticarsia gemmatalis* Hübner (гусінь оксамитових бобів); *Athetis mindara* Barnes and McDunnough (шорстка совка); *Earias insulana* Boisduval (совка бавовняна єгипетська); *E. vittella* Fabricius (совка плямиста); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (цитрусова совка); *Euxoa messoria* Harris (чорнобока гусінь совки); *Helicoverpa armigera* Hübner (совка щітинконога резедова); *H. zea* Boddie (совка кукурудзяна або бавовняна совка); *Heliothis virescens* Fabricius (тютюнова листовійка); *Hypena scabra* Fabricius (совка конюшинова); *Mamestra configurata* Walker (совка Берта); *M. brassicae* Linnaeus (совка капустияна); *Melanchra picta* Harris (совка); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (совка лугова); *Pseudoplusia includens* Walker (соєва совка); *Richia albicosta* Smith (личинка західної бобової совки); *Spodoptera frugiperda* JE Smith (совка трав'яна); *S. exigua* Hübner (совка мала);

5 *S. litura* Fabricius (тютюнова совка, гусінь, яка поїдає суцвіття); *Trichoplusia ni* Hübner (совка ні);
 вогнівки, чохлоноски, метелики, які будують павутинні гнізда, конусні метелики та шкідники, які
 скелетують листя, з родин Pyralidae та Crambidae, такі як *Achroia grisella* Fabricius (мала воскова
 міль); *Amyelois transitella* Walker (гусінь, що пошкоджує рубчики цитрусових); *Anagasta kuehniella*
 10 Zeller (вогнівка вітрякова); *Cadra cautella* Walker (вогнівка сухофруктова); *Chilo partellus* Swinhoe
 (вогнівка кукурудзяна стеблова); *C. suppressalis* Walker (жовта рисова вогнівка); *C. terrenellus*
 Pagenstecher (вогнівка очеретяна стеблова); *Coryca cephalonica* Stainton (вогнівка рисова);
Crambus caliginosellus Clemens (вогнівка кукурудзяна); *C. teterrellus* Zincken (вогнівка злакова);
 15 *Snaphalocrocis medinalis* Guenée (листовійка рисова); *Desmia funeralis* Hübner (виноградна
 листовійка); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (динна вогнівка); *D. nitidalis* Stoll (вогнівка огірків-пікулі);
Diatraea grandiosella Dyar (вогнівка кукурудзяна південно-західна), *D. saccharalis* Fabricius
 (очеретяна вогнівка); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (малий кукурудзяний метелик); *Eoreuma*
loftini Dyar (мексиканська рисова вогнівка); *Ephesia elutella* Hübner (вогнівка тютюнова
 (шоколадна)); *Galleria mellonella* Linnaeus (велика воскова міль); *Hedylepta accepta* Butler
 20 (очеретяна листовійка); *Herpetogramma licarsialis* Walker (лучний метелик); *Homoeosoma*
electellum Hulst (вогнівка-трав'янка); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (лучний метелик); *Maruca*
testulalis Geyer (вогнівка акацієва); *Orthaga thyrisalis* Walker (чайна міль); *Ostrinia nubilalis* Hübner
 (вогнівка кукурудзяна); *Plodia interpunctella* Hübner (міль індійська борошняна); *Scirpophaga*
incertulas Walker (вогнівка рисова стеблова); *Udea rubigalis* Guenée (вогнівка іржаво-коричнева);
 25 та листовійки, листовійки-брунькоїди, плодожерки та гусені-шкідники плодів із родини Tortricidae
Acleris gloverana Walsingham (західна чорноголова листовійка); *A. variana* Fernald (східна
 чорноголова листовійка); *Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm (листовійка сітчата);
Archips spp., в тому числі *A. argyrospila* Walker (листовійка плодових дерев) та *A. rosana*
 Linnaeus (європейська листовійка); *Argyrotaenia* spp.; *Bonagota salubricola* Meyrick (листовійка
 30 бразильська яблучна); *Choristoneura* spp.; *Cochylis hospes* Walsingham (смугаста соняшникова
 міль); *Cydia latiferreana* Walsingham (ліщинна плодожерка); *C. pomonella* Linnaeus (яблунева
 плодожерка); *Endopiza viteana* Clemens (листовійка виноградна); *Eupoecilia ambiguella* Hübner
 (листовійка гронова); *Grapholita molesta* Busck (плодожерка східна персикова); *Lobesia botrana*
 Denis & Schiffermüller (листовійка європейська виноградна); *Platynota flavedana* Clemens
 (листовійка мінлива); *P. stultana* Walsingham (листовійка всеїдна); *Spilonota ocellana* Denis &
 Schiffermüller (листовійка брунькова) та *Suleima helianthana* Riley (листовійка соняшникова).

Інші вибрані сільськогосподарські шкідники з ряду Lepidoptera включають без обмеження
Alsophila pometaria Harris (осінній плодовий черв'як); *Anarsia lineatella* Zeller (міль фруктова
 смугаста); *Anisota senatoria* J.E. Smith (сатурнія оранжева дубова); *Antheraea pernyi* Guérin-
 35 Méneville (китайський дубовий шовкопряд); *Bombyx mori* Linnaeus (шовковичний шовкопряд);
Bucculatrix thurberiella Busck (кривовуса бавовняна міль); *Colias eurytheme* Boisduval (люцернова
 жовтяниця); *Datana integerrima* Grote & Robinson (чубатка горіхова); *Dendrolimus sibiricus*
Tschetwerikov (сибірський шовкопряд), *Ennomos subsignaria* Hübner (п'ядун ільмовий); *Erannis*
tiliaria Harris (п'ядун липовий); *Erechthias flavistriata* Walsingham (міль бруньки цукрової
 40 тростини); *Euproctis chryorrhoea* Linnaeus (шовкопряд золотистий); *Harrisina americana* Guérin-
 Méneville (піроморфіда американська); *Heliopsis subflexa* Guenée; *Hemileuca oliviae* Cockrell
 (гусінь сатурнії); *Hyphantria cunea* Drury (американський білий метелик); *Keiferia lycopersicella*
 Walsingham (томатна міль); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (п'ядун тсуговий східний); *L.*
fiscellaria lugubrosa Hulst (п'ядун тсуговий західний); *Leucoma salicis* Linnaeus (волнянка мулова);
 45 *Lymantria dispar* Linnaeus (непарний шовкопряд); *Malacosoma* spp.; *Manduca quinquemaculata*
 Haworth (бражник п'ятиточковий, томатний бражник); *M. sexta* Haworth (томатний бражник,
 тютюновий бражник); *Oreopterha brumata* Linnaeus (п'ядун зимовий); *Orgyia* spp.; *Paleacrita*
vernata Peck (п'ядун весняний); *Papilio cresphontes* Cramer (косатець велетенський); *Phryganidia*
californica Packard (коконопряд кільчастий каліфорнійській); *Phyllocnistis citrella* Stainton
 50 (цитрусова муха-мінер); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (міль-строкатка плодова
 нижньостороння); *Pieris brassicae* Linnaeus (білан капустяний великий); *P. rapae* Linnaeus (білан
 капустяний малий); *P. napi* Linnaeus (білан бруквяний); *Platyptilia carduidactyla* Riley
 (пальцекрилка артишокова); *Plutella xylostella* Linnaeus (міль капустяна); *Pectinophora gossypiella*
 Saunders (рожевий коробковий черв'як); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte (клітчастий білан);
 55 *Sabulodes aegrotata* Guenée (всеїдний п'ядун); *Schizura concinna* J.E. Smith (хохлатка); *Sitotroga*
cerealella Olivier (міль ячмінна ангумуазька); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermüller (похідний
 шовкопряд сосновий); *Tineola bisselliella* Hummel (міль кімнатна); *Tuta absoluta* Meyrick (томатна
 міль) та *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаєва міль плодова).

60 Становлять інтерес личинки та імаго з ряду Coleoptera, у тому числі довгоносики з родин
 Anthribidae, Bruchidae та Curculionidae, у тому числі без обмеження: *Anthonomus grandis*

Boheman (довгоносик бавовняний); *Cylindrocopturus adpersus* LeConte (довгоносик соняшниковий стебловий); *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (довгоносик з роду *Diaprepes*); *Hypera punctata* Fabricius (довгоносик точковий); *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel (довгоносик рисовий водяний); *Metamasius hemipterus hemipterus* Linnaeus (довгоносик західноіндійський тростинний); *M. hemipterus sericeus* Olivier (довгоносик тростинний); *Sitophilus granarius* Linnaeus (довгоносик амбарний); *S. oryzae* Linnaeus (довгоносик рисовий); *Smicronyx fulvus* LeConte (червоний довгоносик соняшниковий); *S. sordidus* LeConte (сірий довгоносик соняшниковий); *Sphenophorus maidis* Chittenden (довгоносик маїсовий); *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval (довгоносик новогвінейський тростинний); земляні блішки, блішки, кореневі черв'яки, листоїди, картопляні жуки та листові мінери з родини *Chrysomelidae*, у тому числі без обмеження: *Chaetocnema ectura* Horn (блішка стеблова хлібна); *C. pulicaria* Melsheimer (земляна кукурудзяна блішка); *Colaspis brunnea* Fabricius (листоїд виноградний); *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (північний кукурудзяний жук); *D. undecimpunctata howardi* Barber (блішка 11-точкова Говарда); *D. virgifera virgifera* LeConte (західний кукурудзяний жук); *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадський жук); *Oulema melanopus* Linnaeus (п'явиця червоногрудя); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блішка хрестоцвіта); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (соняшниковий листоїд); жуки з родини *Coccinellidae*, у тому числі без обмеження: *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканська квасолева корівка); хрущі та інші жуки з родини *Scarabaeidae*, у тому числі без обмеження: *Antitrogonus parvulus* Britton (личинка жука, яка поїдає цукрову тростину); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляк північний, хрущ); *C. immaculata* Olivier (дупляк південний, хрущ); *Dermolepida albobirtum* Waterhouse (сіроспинний жук, який поїдає цукрову тростину); *Euetheola humilis rugiceps* LeConte (тростинний жук); *Lepidiota frenchi* Blackburn (личинка *Lepidiota*, яка поїдає цукрову тростину); *Tomarus gibbosus* De Geer (жук морквяний); *T. subtropicus* Blatchley (личинка жука, яка поїдає цукрову тростину); *Phyllophaga crinita* Burmeister (хрущ); *P. latifrons* LeConte (червневий хрущ); *Popillia japonica* Newman (хрущик японський); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (нехрущ травневий); шкіроїди з родини *Dermestidae*; дротяники з родини *Elateridae*, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp., в тому числі *M. communis* Gyllenhal (дротяник); *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короїди з родини *Scolytidae* та жуки з родини *Tenebrionidae*; жуки з родини *Cerambycidae*, такі як без обмеження *Aphanisticus cochinchinae seminulum* Obenberger (вуськозлатка, що мінує листя).

Становлять інтерес імаго та незрілі особини ряду *Diptera*, у тому числі мінуючі мушки *Agromyza parvicornis* Loew (кукурудзяна мінуюча мушка); галиці, у тому числі без обмеження: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галиця соргова); *Mayetiola destructor* Say (гессенська муха); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt, (соняшнікова галиця); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (помаранчева зернова галиця); плодові мушки (*Tephritidae*), *Oscinella frit* Linnaeus (плодові мушки); личинки, у тому числі без обмеження: *Delia* spp., у тому числі *Delia platura* Meigen (муха росткова); *D. coarctata* Fallen (муха озима); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (малі кімнатні мухи); *Meromyza americana* Fitch (американська мероміза); *Musca domestica* Linnaeus (кімнатна муха); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалка осіння)); мухи польові, жигалки, мухи м'ясні, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; та інші мухи-шкідники надродина *Muscoidea*, сліпні *Tabanus* spp.; носоглоткові оводи *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; бичачі оводи *Hypoderma* spp.; пістряки *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (рунець овечий); та інші *Brachycera*, комарі *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; мошки *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; мокреці, москити, сціариди та інші *Nematocera*.

Як комахи, що становлять інтерес, включені комахи з ряду *Hemiptera*, такі як без обмеження наступні родини: *Adelgidae*, *Aleyrodidae*, *Aphididae*, *Asterolecaniidae*, *Cercopidae*, *Cicadellidae*, *Cicadidae*, *Cixiidae*, *Coccidae*, *Coreidae*, *Dactylopiidae*, *Delphacidae*, *Diaspididae*, *Eriococcidae*, *Flatidae*, *Fulgoridae*, *Issidae*, *Lygaeidae*, *Margarodidae*, *Membracidae*, *Miridae*, *Ortheziidae*, *Pentatomidae*, *Phoenicococcidae*, *Phylloxeridae*, *Pseudococcidae*, *Psyllidae*, *Pyrrhocoridae* та *Tingidae*.

Важливі з погляду сільського господарства представники ряду *Hemiptera* включають без обмеження: *Acrosternum hilare* Say (клоп-щитник зелений); *Acyrtosiphon pisum* Harris (попелиця горохова); *Adelges* spp. (хермеси); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп люцерновий); *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик сумний); *Aphis craccivora* Koch (попелиця люцернова; *A. fabae* Scopoli (попелиця бурякова); *A. gossypii* Glover (попелиця бавовняна, попелиця баштанна); *A. maidiradicis* Forbes (попелиця кукурудзяна коренева); *A. pomi* De Geer (попелиця яблунева); *A. spiraecola* Patch (попелиця зелена цитрусова); *Aulacaspis tegalensis* Zehntner (щитівка тростинна); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (попелиця картопляна звичайна), *Bemisia tabaci* Gennadius (білокрилка тютюнова, білокрилка бавовняна); *B. argentifolii* Bellows & Perring

(білокрилка магнолієва); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп-черепашка пшеничний північноамериканський); *Blostomatidae* spp.; *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (попелиця капустяна); *Sacopsylla pyricola* Foerster (мідяниця грушева); *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картопляний); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (попелиця сунична американська); *Cimicidae* spp.; *Coreidae* spp.; *Corythuca gossypii* Fabricius (клоп бавовняний); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатний); *C. notatus* Distant (сніпняк); *Deois flavopicta* Stål (пінниця); *Dialeurodes citri* Ashmead (білокрилка цитрусова); *Diuraphis chlorionis* Say (клоп-шкідник гледичії); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (попелиця ячмінна); *Duplacionaspis divergens* Green (цитівка); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (попелиця яблунево-подорожникова); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (красноклоп бавовняний); *Dysmicoccus boninsis* Kuwana (сірий очеретяний борошнистий червець); *Empoasca fabae* Harris (цикадка картопляна); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (попелиця кров'яна); *Erythroneoura* spp. (цикадки виноградні); *Eumetopina flavipes* Muir (цикадка острівна тростинна); *Eurygaster* spp.; *Euschistus servus* Say (щитник коричневий); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (клоп одноплямистий); *Graptostethus* spp. (комплекс клопів-наземників); та *Hyalopterus pruni* Geoffroy (попелиця борошнеста сливова); *Icerya purchasi* Maskell (червець жолобчастий австралійський); *Labopidicola allii* Knight (жук-шкідник рослин цибулі); *Laodelphax striatellus* Fallen (темна цикадка); *Leptoglossus scorcus* Say (сосновий сім'яний клоп); *Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer (клоп тростинний); *Lipaphis erysimi* Kaltentbach (попелиця гірчична листовая); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зелений сніпняк); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп лучний); *L. hesperus* Knight (клоп лучний західний); *L. pratensis* Linnaeus (клоп трав'яний); *L. rugulipennis* Poppius (клоп польовий); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (попелиця картопляна велика); *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (цикадка астрова); *Magisicada septendecim* Linnaeus (цикада сімнадцятирічна); *Mahanarva fimbriolata* Stål (пінниця тростинна); *Melanaphis sacchari* Zehntner (попелиця тростинна); *Melanaspis glomerata* Green (червець чорний); *Metopolophium dirhodum* Walker (попелиця розанно-злакова); *Myzus persicae* Sulzer (попелиця оранжерейна, попелиця персикова зелена); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (попелиця цикорієво-смородинова); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадка зелена); *N. nigropictus* Stål (цикадка рисова); *Nezara viridula* Linnaeus (зелений овочевий клоп); *Nilaparvata lugens* Stål (бура цикадка); *Nysius ericae* Schilling (нізиус вересковий); *Nysius raphanus* Howard (нізиус); *Oebalus pugnax* Fabricius (клоп-щитник рисовий); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (клоп молочайний); *Orthops campestris* Linnaeus; *Pemphigus* spp. (попелиці кореневі та попелиці галові); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикадка кукурудзяна); *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (дельфацида тростинна); *Phylloxera devastatrix* Pergande (філоксера гікорі); *Planococcus citri* Risso (борошнистий червець цитрусовий); *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблуневий); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (клоп чотиризмуговий трав'яний); *Pseudatomoscelis seriata* Reuter (бавовняний сніпняк); *Pseudococcus* spp. (інші борошнисті червці); *Pulvinaria elongata* Newstead (червець пушицевий); *Pyrilla perpusilla* Walker (цикадка тростинна); *Pyrhocoridae* spp.; *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (щитівка каліфорнійська); *Reduviidae* spp.; *Rhopalosiphum maidis* Fitch (попелиця соргова); *R. padi* Linnaeus (попелиця черемхова звичайна); *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (очеретяний борошнистий червець); *Schizaphis graminum* Rondani (попелиця злакова звичайна); *Sipha flava* Forbes (попелиця цукрової тростини жовта); *Sitobion avenae* Fabricius (попелиця злакова); *Sogatella furcifera* Horvath (цикадка білоспинна); *Sogatodes oryzicola* Muir (дельфацида рисова); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (сніпняк білокрапчастий); *Therioaphis maculata* Buckton (плямиста люцернова попелиця); *Tinidae* spp.; *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (попелиця померанцева); та *T. citricida* Kirkaldy (попелиця цитрусова); *Trialeurodes abutiloneus* (білокрилка смугастокрила) та *T. vaporariorum* Westwood (білокрилка теплична); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблішка хурмова); та *Typhlocyba rotaria* McAtee (цикадка яблунева).

Також включені імаго та личинки з ряду *Acar*i (кліщі), такі як *Aceria tosichella* Keifer (галовий кліщ пшеничний); *Panonychus ulmi* Koch (червоний плодовий кліщ); *Petrobia latens* Müller (петробія багатодіна); *Steneotarsonemus bancrofti* Michael (кліщ, який пошкоджує стебло цукрової тростини); кліщики павутинні та кліщики червоні родини *Tetranychidae*, *Oligonychus grypus* Baker & Pritchard, *O. indicus* Hirst (кліщ листовий тростинний), *O. pratensis* Banks (трав'яний кліщ Бенкса), *O. stickneyi* McGregor (кліщ павутинний тростинний); *Tetranychus urticae* Koch (кліщ павутинний двоплямистий); *T. mcdanieli* McGregor (кліщик МакДенієла); *T. cinnabarinus* Boisduval (червоний павутинний кліщик); *T. turkestanii* Ugarov & Nikolski (туркестанський павутинний кліщик); плоскі кліщі родини *Tenuipalpidae*, *Brevipalpus lewisi* McGregor (помаранчевий кліщ); іржасті та брунькові кліщі родини *Eriophyidae* та інші кліщі, які годуються листям, та кліщі, важливі для здоров'я людини та тварин, тобто пилові кліщі родини *Epidermoptidae*, желізниці родини *Demodicidae*, зернові кліщі родини *Glycyphagidae*, іксодові

кліщі ряду Ixodidae. *Ixodes scapularis* Say (чорноногий кліщ); *I. holocyclus* Neumann (австралійський паралітичний кліщ); *Dermacentor variabilis* Say (кліщ іксодовий собачий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (іксодовий кліщ *Amblyomma*) та кінські та коростяні кліщі родин Psoroptidae, Pyemotidae та Sarcoptidae.

5 Комахами-шкідниками з ряду Thysanura, що становлять інтерес, є, наприклад, *Lepisma saccharina* Linnaeus (лусочниця); *Thermobia domestica* Packard (термобія домашня).

Додаткові охоплені шкідники-артроподи включають павуків із ряду Araneae, таких як *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (бурий павук-відлюдник) та *Latrodectus mactans* Fabricius (чорна вдова), та багатоніжок із ряду Scutigeraomorpha, таких як *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (звичайна мухоловка). Крім того, інтерес становлять комахи-шкідники з ряду Isoptera, у тому числі з родини Termitidae, такі як без обмеження *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren та *Pseudacanthotermes militaris* Hagen (тростинний терміт). Інтерес також становлять комахи з ряду Thysanoptera, в тому числі без обмеження трипси, такі як *Stenchaetothrips minutus* van Deventer (тростинний трипс).

15 Пестицидну активність композицій згідно з варіантами здійснення можна тестувати на комах-шкідниках на ранніх стадіях розвитку, наприклад, у вигляді личинок або інших незрілих форм. Комах можна розводити в повній темряві при температурі від приблизно 20 °C до приблизно 30 °C та за відносної вологості від приблизно 30 % до приблизно 70 %. Біологічні аналізи можна здійснювати, як описано в Czaplak and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83(6): 2480-2485. Способи розведення личинок комах та проведення біологічних аналізів добре відомі фахівцю в даній галузі.

20 Фахівцю в даній галузі відомий широкий спектр методик біологічних аналізів. Загальні процедури включають додавання експериментальної сполуки або організму до джерела їжі в закритому контейнері. Пестицидну активність можна виміряти без обмеження за вимірюваннями смертності, втратою ваги, привабливості, відлякування, а також іншими змінами поведінки та фізичними змінами після живлення та впливу протягом відповідного періоду часу. Біологічні аналізи, описані в даному документі, можна використовувати з будь-якою комахою-шкідником, що харчується, на стадії личинки або імаго.

25 Наступні приклади представлені як ілюстративні, а не для обмеження. Як застосовується у даному документі, форми однини включають посилання на множину, якщо у контексті явно не вказано інше. Так, наприклад, посилання на "клітину" включає множину таких клітин, а посилання на "білок" включає посилання на один або декілька білків та їхніх еквівалентів, відомих фахівцям у даній галузі, тощо. Усі технічні та наукові терміни, що застосовуються в даному документі, мають те ж саме значення, що звичайно зрозуміле фахівцю в галузі техніки до якої належить даний винахід, якщо явно не вказано інше.

30 Усі публікації та заявки на патент, згадані в даному описі, орієнтовані на рівень фахівця в галузі до якої належить даний винахід. Усі публікації та заявки на патент включені в даний документ за допомогою посилання у тій же мірі, як якщо б кожна окрема публікація або заявка на патент спеціально та окремо була включена за допомогою посилання.

35 Хоча для ясності розуміння наведений вище винахід було достатньо докладно описано за допомогою ілюстрації та прикладу, очевидно, що на практиці можна здійснювати певні зміни та модифікації у межах обсягу варіантів здійснення.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1. Ідентифікація гена та експресія в *E. coli*

45 Ген, що кодує інсектицидний білок із SEQ ID NO: 4, одержували зі штаму *Bacillus thuringiensis*, позначеного як UZ348. Вибраний штам Bt вирощували в 30 мл середовища протягом 16 годин зі струшуванням за 250 об./хв. Виділену ДНК виділяли з клітин за допомогою набору від Macherey-Nagel (№ у каталозі 740521). Потім ДНК секвенували за допомогою Illumina HiSeq2500, збирали та описували. Потім вибирали ген, що становить інтерес.

50 Кодувальну послідовність із SEQ ID NO: 3, для інсектицидного поліпептиду із SEQ ID NO: 4 та кодувальні послідовності для варіантів SEQ ID NO: 4, які включають SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9 синтезували та клонували у вектор pET28a (Novagen®) та трансформували в клітини *E. coli* BL21 (Invitrogen). Культури у збільшеному масштабі 1,0 л вирощували до O.D. за 600 нм~0,8, а потім культури індукували 1 мМ ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозидом (IPTG) та забезпечували можливість їхнього росту протягом 16 годин за 16 °C. Клітинні осадки лізували в 50 мл 500 мМ NaCl/20 мМ Tris/5 мМ імідазолу/pH 7,9 з використанням 0,02 % лізоциму (вага/об'єм) та 0,1 % Tween-20 та додавали 1 таблетку повного інгібітора протеаз (Roche). Після лізису розчини піддавали ультразвуковій обробці та лізат центрифугували при 25000 об./хв. протягом 30 хвилин. Супернатант, який містить фракцію розчинних білків, фільтрували через 0,45 мкм вакуумний фільтр, а потім додавали 1 мл зависі

Talon (Clontech) та після цього інкубували для зв'язування на пристрої, що обертається при 100 об./хв. протягом 1 години. Лізат потім додавали в колонку та зв'язаний білок виділяли та промивали 20 мл 50 mM NaCl/ 20 mM Tris/ 5 mM імідазолу/ pH 7,9, а потім елюювали 1,5 мл 50 mM NaCl/ 20 mM Tris/500 mM імідазолу/pH 7,9. Очищений білок потім піддавали діалізу в 50 mM буфері на основі карбонату натрію з pH 10. Очищений білок передавали для дослідження інсектицидної активності в наборі аналізів *in vitro* з живленням *Lepidoptera*.

Приклад 2. Аналізи на *Lepidoptera* з частково очищеними білками

Біологічні скринінг-аналізи інсектицидної активності проводили для оцінки ефектів інсектицидних білків щодо ряду видів *Lepidoptera*: вогнівки кукурудзяної (*Ostrinia nubilalis*), бавовняної совки (*Helicoverpa zea*), совки-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совки трав'яної (*Spodoptera frugiperda*), соєвої совки (*Pseudoplusia includens*) та гусені оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatalis*).

Аналізи з живленням *Lepidoptera* проводили на штучному раціоні, який містить очищений білок, у системі з використанням 96-лункового планшета. Очищений білок (25 мкл) потім додавали до штучного раціону. Дві з п'яти новонароджених личинок поміщали в кожен лунку для годування *ad libitum* протягом 5 днів. Результати виражали як позитивні реакції щодо личинок, такі як зупинка розвитку та/або смерть. Результати виражали як негативні, якщо личинки були подібні до негативного контролю, який живиться раціоном, в який вносили тільки вищевказаний буфер. Первинний скринінг за допомогою біологічного аналізу здійснювали для кожного очищеного білка при одній концентрації з використанням вогнівки кукурудзяної (*Ostrinia nubilalis*), бавовняної совки (*Helicoverpa zea*), совки-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совки трав'яної (*Spodoptera frugiperda*), соєвої совки (*Pseudoplusia includens*) та гусені оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatalis*). Аналізи з використанням комах оцінювали наступним чином: 3=100 % смертність; 2 = сильне уповільнення росту; 1 = уповільнення росту та 0 = відсутність активності.

Первинні результати аналізу інсектицидної активності для інсектицидних поліпептидів із SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10 представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Місце/крапельне застосування з використанням планшета	4 повторності для всіх комах						
	Первинний скринінг	Концентрація (мкг/см ²)	BCW	CEW	ECB	FAW	SBL
SEQ ID NO: 2	15	0	0	0	0	2,67	NT
SEQ ID NO: 4	15	0	0	0	0	2,67	NT
SEQ ID NO: 6	19,36	0	2	1	2,5	2,25	1,5
SEQ ID NO: 8	22,9	0	2	0	0	3	0
SEQ ID NO: 10	6,19	0	2,25	0	2,25	3	0

Для інсектицидного поліпептиду із SEQ ID NO: 6 після первинного біологічного аналізу серію концентрацій відповідних зразків очищеного білка також досліджували щодо набору CEW і FAW.

Для інсектицидного поліпептиду із SEQ ID NO: 6 розраховували серію концентрацій білка із SEQ ID NO: 6 та концентрацій для 50 % смертності (LC50) або пригнічення росту 50 % особин (IC50). Результати LC50/IC50 для інсектицидного поліпептиду із SEQ ID NO: 6 представлені в таблиці 6.

Таблиця 6

Комаха (Новонароджені)	LC/IC	LC/IC50 (ppm)
CEW	LC50	27,62
	IC50	3,463
FAW	LC	1,996
	IC	0,8976

Приклад 3. Перехресна стійкість щодо інсектицидних поліпептидів у стійкої до Cry1F лінії совки трав'яної (FAW)

Біологічні аналізи на комах Lepidoptera зі включенням стандартизованого раціону використовували для оцінювання впливу SEQ ID NO. 6 на личинок FAW. Білок об'єднували зі специфічним штучним раціоном для Lepidoptera з одержанням раціону для біологічного аналізу. На основі результатів аналізу з визначення діапазону тестовані концентрації становили 0,156-40 ppm за 2-кратних розведень як чутливих, так і стійких до Cry1F ліній FAW. В аналізі у форматі 96-лункового планшета використовували 4 групи паралельних зразків для всіх концентрацій обробок плюс буфер для контролю та 8 лунок у кожному планшеті для кожної концентрації. Одну новонароджену личинку FAW поміщали в кожну лунку в планшетах, які містять раціон для біологічного аналізу й інсектицидний білок. Усі планшети інкубували при 26,7±1°C протягом 4 днів після початку кожного біологічного аналізу. Дані щодо смертності на основі загибелі використовували для розрахунку 50 % летальної концентрації (LC50) на основі пробіт-аналізу. Як смертність, так і число сильних уповільнень розвитку оцінювали й об'єднували як загальну відповідь для розрахунку 50 % інгібування в окремих особин (IC50). Розраховували співвідношення стійкості (RR) з урахуванням LC/IC50 білка щодо чутливої та стійкої лінії FAW:

$$RR = LC \text{ або } IC50 \text{ стійкої лінії} / LC \text{ або } IC50 \text{ чутливої лінії}$$

У таблиці 7 показано, що лінія FAW, стійка до Cry1F, не мала перехресної стійкості до SEQ ID NO: 6 (RR=0,4 на основі IC50).

Таблиця 7

Лінія FAW	LC/IC	SEQ ID NO: 6, ppm (4d)	нижче за 95 %CL	вище за 95 %CL	Співвідношення Res (RR)
FAW SS	LC50	2,374	1,729	3,207	1,0
	IC50	1,921	1,398	2,576	1,0
Cry1F-res	LC50	22,76	11,89	98,87	9,6
	IC50	0,8192	0,1652	1,760	0,4

SS = чутлива лінія

Res = стійка лінія

20

Приклад 4. Agrobacterium-опосередкована трансформація маїсу та регенерація трансгенних рослин

Для Agrobacterium-опосередкованої трансформації маїсу за допомогою полінуклеотидної послідовності (наприклад, SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 3) можна застосовувати спосіб Zhao (патент США № 5981840 та PCT публікація патентної заявки WO98/32326; зміст яких включено в даний документ за допомогою посилання). Коротко, незрілі зародки виділяли з маїсу та зародки приводили в контакт із суспензією Agrobacterium в умовах, за яких бактерії були здатні переносити нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 3) щонайменше в одну клітину щонайменше одного з незрілих зародків (стадія 1: стадія інфікування). На цій стадії незрілі зародки можна занурювати в суспензію Agrobacterium для ініціації інюкуляції. Зародки протягом певного часу культивували разом з Agrobacterium (стадія 2: стадія сумісного культивування). Незрілі зародки можна культивувати на твердому середовищі після стадії інфікування. Після періоду спільного культивування передбачалася необов'язкова стадія "спокою". На цій стадії спокою зародки інкубували в присутності щонайменше одного антибіотика, який, як відомо, інгібує ріст Agrobacterium, без додавання засобу для відбору для рослинних трансформантів (стадія 3: стадія спокою). Незрілі зародки можна культивувати на твердому середовищі з антибіотиком, але без засобу для відбору, для виключення Agrobacterium та протягом фази спокою для інфікованих клітин. Потім інокульовані зародки культивували на середовищі, яке містить засіб для відбору, та виділяли трансформований калюс, що росте (стадія 4: стадія відбору). Незрілі зародки культивували на твердому середовищі з засобом для відбору, що приводило до вибіркового росту трансформованих клітин. Потім індукували регенерування калюсу з одержанням рослин (стадія 5: стадія регенерації) та калюси, вирощені на селективному середовищі, культивували на твердому середовищі для регенерації рослин.

45

Приклад 5. Трансформація зародків сої

Зародки сої піддавали бомбардуванню плазмідною, що містить нуклеотидну послідовність токсину із SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 3, функціонально пов'язану з придатним промотором, як вказано нижче. Для індукції соматичних зародків сім'ядолі довжиною 3-5 мм, вирізані з

поверхнево-стерилізованих, незрілих насінин відповідного сорту сої, культивували на світлі або в темряві при 26 °С на відповідному агаровому середовищі протягом шести-десяти тижнів. Соматичні зародки, які дають вторинні зародки, потім вирізали та поміщали в придатне рідке середовище. Після повторного відбору щодо кластерів соматичних зародків, поділ клітин у яких

5

уже призвів до зародків на стадії глобули, суспензії підтримували, як описано нижче. Соеві зародкові суспензійні культури можна підтримувати в 35 мл рідкого середовища на ротаційному шейкері при 150 об./хв. при 26 °С з флуоресцентними джерелами світла відповідно до схеми день/ніч 16:8 годин. Культури пересівали кожні два тижні шляхом інокуляції приблизно 35 мг тканини в 35 мл рідкого середовища.

10

Соеві зародкові суспензійні культури потім можна трансформувати за допомогою способу бомбардування генною гарматою (Klein, et al., (1987) Nature (London) 327:70-73, патент США № 4945050). Для цих трансформацій можна застосовувати пристрій Biolistic PDS1000/HE від Du Pont (геліева модифікація).

15

Селективний маркерний ген, який можна застосовувати для полегшення трансформації сої, без обмеження передбачав наступне: промотор 35S із вірусу мозаїки цвітної капусти (Odell, et al., (1985) Nature 313:810-812), ген гіроміцин-фосфотрансферази з плазмиди pJR225 (з E. coli; Gritz, et al., (1983) Gene 25:179-188) та 3'-ділянку з гена нопалін-синтази з Т-ДНК Ті-плазмиди Agrobacterium tumefaciens. Касету експресії, що містить нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 3), функціонально пов'язану з придатним промотором, можна виділяти у вигляді рестрикційного фрагмента. Цей фрагмент потім можна вставити в унікальний рестрикційний сайт вектора, який несе маркерний ген.

20

До 50 мкл суспензії 1 мкм золотих частинок за концентрації 60 мг/мл додавали (по черзі): 5 мкл ДНК (1 мкг/мкл), 20 мкл спермідину (0,1 М) та 50 мкл CaCl₂ (2,5 М). Препарат частинок потім перемішували протягом трьох хвилин, центрифугували з застосуванням мікроцентрифуги протягом 10 секунд та видаляли супернатант. Покриті ДНК частинки потім однократно промивали в 400 мкл 70 % етанолу та ресуспендували в 40 мкл безводного етанолу. Суспензію ДНК/частинки можна обробляти ультразвуком три рази протягом однієї секунди. П'ять мікролітрів золотих частинок, вкритих ДНК, потім завантажували на кожний диск-макроносій.

25

Близько 300-400 мг двотижневої суспензійної культури поміщали в порожню 60 × 15 мм чашку Петрі та залишкову рідину видаляли з тканини за допомогою піпетки. Для кожного трансформаційного експерименту зазвичай піддавали бомбардуванню приблизно 5-10 планшетів з тканиною. Встановлювали тиск розриву мембрани 1100 фунт./кв. дюйм., та в камері створювали вакуум зі зниженням тиску до 28 дюймів ртутного стовпчика. Тканину розташовували на відстані приблизно 3,5 дюйма від затримувального екрану та бомбардували три рази. Після бомбардування тканину можна розділити навпіл, і помістити назад в рідину, і культивувати, як описано вище.

30

Через п'ять-сім днів після бомбардування рідке середовище можна замінити свіжим середовищем, а через одинадцять-дванадцять днів після бомбардування замінити свіжим середовищем, яке містить 50 мг/мл гіроміцину. Дане селективне середовище можна поновлювати щотижня. Через сім-вісім тижнів після бомбардування можна спостерігати зелену трансформовану тканину, яка росте з нетрансформованих некротичних зародкових кластерів. Виділену зелену тканину відбирали та інокулювали в окремі колби для одержання нових, клонально розмножених, трансформованих зародкових суспензійних культур. Кожну нову лінію можна розглядати як незалежний об'єкт трансформації. Дані суспензії потім можна пересівати та підтримувати у вигляді кластерів незрілих зародків або регенерувати в цілі рослини шляхом визрівання та пророщування окремих соматичних зародків.

35

40

45

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

50

<110> ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕСНЛ, ІНК.

АБАД, АНДРЕ Р. КРОУ, ЕНДРЮ КАРЛ ПОЛАНД, БРЕД ШИ, СЯОМЕЙ ВУЛФ, ТОМАС ЧАД.

55

<120> ІНСЕКТИЦИДНІ ПОЛІПЕПТИДИ, ЩО МАЮТЬ ШИРОКИЙ СПЕКТР АКТИВНОСТІ, ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 6059-WO-PCT

60

<150> US 62/064848

<151> 2014-10-16

<160> 10

5 <170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 2256

<212> ДНК

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіант MP589FL

15 <400> 1

atggagggaa ataatctaaa tcaatgcata ccttacaatt gtttaagtaa tcctaaggac 60

ataatattag gtgatgaaag gctagaaact ggtaatactg tagcagacat taccttaggg 120

20 attgtcaatc tattgttttc tgagtttggt cctgggtggag gctttatact aggattactg 180

gatttaatat gggggctctat aggtcgttcc caatgggatc ttttctgga acagattgaa 240

caattgatta agcaaagaat agaagaattt gctaggaatc aggcaatttc aagattggag 300

25 gggctaagcg atctttataa gacctatgct agagcgttta gcgattggga ggcagatccg 360

actaatccag cattaaggga agaaatgcgt atacaattta atgacatgaa tagtgctatc 420

30 ataacggctc tcccactttt tagagttcaa aattatgaag ttgctctttt atctgtttat 480

gttcaagctg caaacttaca tttatctatt ttaagagatg tttcagtctt tggagaaaga 540

tggggatag atacagcaac tatcaataat cgctatagtg acttaactag ccttattcat 600

35 gtttatacta atcattgtgt ggatacgtat aatcagggat taaggcgttt ggaaggctcg 660

tttcttaccg attggattgt atataatcgt ttccgaagac aattaacaat ttcagtatta 720

40 gatattggtg cttttttcc aaattatgat attcgaacat atccaattca aacagctact 780

cagctaacga gggaaatcta tctggattta ctttttatta atgaaaatct ttctcctgca 840

gcaagctatc cctcattctc agatgctgaa agtgctataa tcaggagtcc tcatttagtg 900

45 gactttttaa atagcttcac ttttataca gatagtcttg ctcgatattt atattgggga 960

gggcatcggg tgaattttac ccgttcagga gttactactt ttatacaatc accactatat 1020

50 ggaaggggaag gaaatgcaga gcgttctgta attatttcgg catcatctag cgtaccaata 1080

tttagaacac tttcatatgt tactggcctt gacaatgcaa atcctgtagc tggaattgaa 1140

ggagtggaat tccaaaatac tataagtaga agtatctatc gtaaaagtgg tccaattgat 1200

55 tcttttaatg aattaccacc tcaagatgcc agtgatctc cttcaattgg gtatagtcac 1260

cgtttatgtc atgccacatt tttagaacgg attagtggac caagaattgc aggtgtcgtt 1320

60 ttttcctgga cacatcgtag tgctagccct actaatgaag taagttcatc tagaattaca 1380

UA 124757 C2

caaattccat gggtaaaggc gcatactctt gcgtctggtg cctccgttat taaagggcct 1440
 ggatttacag gtggagatat actaactagg aataccttag gcgaactggg gactttaaga 1500
 5 gtaacttttg caggaagatt atcaciaagt tattatatac gtttccgtta tgcttccgta 1560
 gctaatagga gtggtatatt tagctattca cagccaactt catatggaat ttcctttcca 1620
 aaaactatgg atgcagatga atcattaaca tctcgttcat ttgcacttgc tacacttgct 1680
 10 acaccgctaa cctttagaag gcaagaagaa ttaaactctac aaataccatc aggtacttat 1740
 atagatcgaa ttgagtttgt tccagtcgat gaaaccttta caacagaatc tgatctggat 1800
 15 agagcacaac aggcgggtgaa tgcgctgttt acttcttcca atcaaactcg cttaaaaaca 1860
 gatgtgacgg attatcatat tgatcaagta tccaatttag tggattgttt atcggatgaa 1920
 ttttgtctgg atgaaaagcg agaattgtcc gagaaagtca aacatgcgaa gcgactcagt 1980
 20 gatgagcggg atttacttca agatccaaac tttagaggaa tcaatagaca accagaccgt 2040
 ggttgagag gaagtacaga tattaccatc caaggaggag atgacgtatt caaagagaat 2100
 25 tacgttacac taccaggtac ctttgatgag tgctatccaa cgtatttata tcaaaaaata 2160
 gatgagtcga aattaaaagc ctatacccggt taccaattaa gagggtatat cgaagatagt 2220
 caagacttag aaatctattt aattcgctac aattga 2256
 30

<210> 2
 <211> 751
 <212> Білок
 35 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> варіант MP589FL aa

40 <400> 2

Met Glu Gly Asn Asn Leu Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser
 1 5 10 15

45 Asn Pro Lys Asp Ile Ile Leu Gly Asp Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
 20 25 30

50 Thr Val Ala Asp Ile Thr Leu Gly Ile Val Asn Leu Leu Phe Ser Glu
 35 40 45

55 Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Leu Gly Leu Leu Asp Leu Ile Trp
 50 55 60

60 Gly Ser Ile Gly Arg Ser Gln Trp Asp Leu Phe Leu Glu Gln Ile Glu
 65 70 75 80

UA 124757 C2

Gln Leu Ile Lys Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile
85 90 95

5 Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Tyr Ala Arg Ala
100 105 110

10 Phe Ser Asp Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu
115 120 125

15 Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Ile Ile Thr Ala Leu
130 135 140

20 Pro Leu Phe Arg Val Gln Asn Tyr Glu Val Ala Leu Leu Ser Val Tyr
145 150 155 160

25 Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val
165 170 175

30 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Tyr Asp Thr Ala Thr Ile Asn Asn Arg Tyr
180 185 190

35 Ser Asp Leu Thr Ser Leu Ile His Val Tyr Thr Asn His Cys Val Asp
195 200 205

40 Thr Tyr Asn Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Gly Arg Phe Leu Thr Asp
210 215 220

45 Trp Ile Val Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Gln Leu Thr Ile Ser Val Leu
225 230 235 240

50 Asp Ile Val Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile
245 250 255

55 Gln Thr Ala Thr Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Leu Asp Leu Pro Phe
260 265 270

60 Ile Asn Glu Asn Leu Ser Pro Ala Ala Ser Tyr Pro Ser Phe Ser Asp
275 280 285

65 Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Ser Pro His Leu Val Asp Phe Leu Asn
290 295 300

70 Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Leu Tyr Trp Gly
305 310 315 320

75 Gly His Arg Val Asn Phe Thr Arg Ser Gly Val Thr Thr Phe Ile Gln

UA 124757 C2

Ser Gly Thr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Val Asp Glu Thr
 580 585 590
 5
 Phe Thr Thr Glu Ser Asp Leu Asp Arg Ala Gln Gln Ala Val Asn Ala
 595 600 605
 10
 Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp
 610 615 620
 15
 Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu
 625 630 635 640
 20
 Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala
 645 650 655
 25
 Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg
 660 665 670
 30
 Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile
 675 680 685
 35
 Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu
 690 695 700
 40
 Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile
 705 710 715 720
 45
 Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr
 725 730 735
 Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn
 740 745 750
 50
 <210> 3
 <211> 3492
 <212> ДНК
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 3
 atggaggaa ataatctaaa tcaatgcata ccttacaatt gtttaagtaa tcctaaggac 60
 55 ataatattag gtgatgaaag gctagaaact ggtaatactg tagcagacat taccttaggg 120
 attgtcaatc tattgttttc tgagtttggt cctgggtggag gctttatact aggattactg 180
 gatttaatat gggggctctat aggtcgttcc caatgggatc tatttctgga acagattgaa 240
 60 caattgatta agcaaagaat agaagaattt gctaggaatc aggcaatttc aagattggag 300

UA 124757 C2

gggctaagcg atctttataa gacctatgct agagcgttta gcgattggga ggcagatccg 360
 actaatccag cattaagga agaaatgcgt atacaattta atgacatgaa tagtgctatc 420
 5 ataacggctc tcccactttt tagagttcaa aattatgaag ttgctctttt atctgtttat 480
 gttcaagctg caaacttaca tttatctatt ttaagagatg tttcagtctt tggagaaaga 540
 10 tggggatatg atacagcaac tatcaataat cgctatagtg acttaactag ccttattcat 600
 gttatacta atcattgtgt ggatacgtat aatcagggat taaggcgttt ggaaggtcgt 660
 tttcttaccg attggattgt atataatcgt ttccgaagac aattaacaat ttcagtatta 720
 15 gatattgttg ctttttttcc aaattatgat attcgaacat atccaattca aacagctact 780
 cagctaacga gggaaatcta tctggattta ctttttatta atgaaaatct ttctcctgca 840
 20 gcaagctatc cctcattctc agatgctgaa agtgctataa tcaggagtcc tcatttagtg 900
 gactttttaa atagcttcac tatttataca gatagtcttg ctcgatattt atattgggga 960
 gggcatcggg tgaattttac ccgttcagga gttactactt ttatacaatc accactatat 1020
 25 ggaaggaag gaaatgcaga gcgttctgta attatttcgg catcatctag cgtaccaata 1080
 tttagaacac tttcatatgt tactggcctt gacaatgcaa atcctgtagc tgggaattgaa 1140
 30 ggagtggaat tccaaaatac tataagtaga agtatctatc gtaaaagtgg tccaattgat 1200
 tcttttaatg aattaccacc tcaagatgcc agtgatctc cttcaattgg gtatagtcac 1260
 cgtttatgtc atgccacatt tttagaacgg atttagtgac caagaattgc aggtgtcgtt 1320
 35 ttttctgga cacatcgtag tgctagccct actaatgaag taagttcatc tagaattaca 1380
 caaattccat gggtaaaggc gcatactctt gcgtctggtg cctccgttat taaagggcct 1440
 40 ggatttacag gtggagatat actaactagg aataccttag gcgaactggg gactttaaga 1500
 gtaacttttg caggaagatt atcacaaagt tattatatac gtttccgtta tgcttccgta 1560
 gctaatagga gtggatatt tagctattca cagccaactt catatggaat ttcctttcca 1620
 45 aaaactatgg atgcagatga atcattaaca tctcgttcat ttgcacttgc tacacttgct 1680
 acaccgctaa cttttagaag gcaagaagaa ttaaacttac aaataccatc aggtacttat 1740
 50 atagatcgaa ttgagtttgt tccagtcgat gaaaccttta caacagaatc tgatctggat 1800
 agagcacaac aggcggtgaa tgcgctgttt acttcttcca atcaaactcg cttaaaaaca 1860
 gatgtgacgg attatcatat tgatcaagta tccaatttag tggattgttt atcggatgaa 1920
 55 ttttgtctgg atgaaaagcg agaattgtcc gagaaagtca aacatgcgaa gcgactcagt 1980
 gatgagcggg atttacttca agatccaaac tttagaggaa tcaatagaca accagaccgt 2040
 60 ggttgagag gaagtacaga tattaccatc caaggaggag atgacgtatt caaagagaat 2100

UA 124757 C2

tacgttacac taccaggtac ctttgatgag tgctatccaa cgtatttata tcaaaaaata 2160
gatgagtcga aattaaagc ctatacccg t tatcaattaa gagggatatat cggggatagt 2220
5 caagacttag aaatctatth aattcgttac aatgcaaaac acgaaatagt aaatgtacca 2280
ggtacagggg gtttatggac tctttctgta gaaaattcaa ttggaccttg tggagaaccg 2340
aatcgatgcg cgccacacct tgaatggaat cctaacttag agtggttcttg cagagaaggg 2400
10 gaaaaatgtg cccatcattc ccatcatttc tccttggaaca ttgatgttgg atgtacagac 2460
ttaaattgagg acttaggtgt atgggagata ttcaagatta agacgcaaga tggccatgca 2520
15 agactaggaa atctagagtt tctcgaagag aaaccactat taggggaagc actagctcgt 2580
gtgaaaagag cggagaagaa atggagagac aaacgcgaaa aattggaatg ggaacaaat 2640
attgthtata aagaggcaaa agaactctgta gatgctthtatt ttgtgaactc tcaatatgat 2700
20 agattacaag cggatacgaat tatcgcgatg attcatgcbg cagataaacg cgttcataga 2760
attagagaag cataccttcc agaattatct gtaattcgbg gtgtaaatgc gggcattthc 2820
25 gaagaattag agggacgcat thtcacagcc tactctctat atgatgcbg aaatgtcatt 2880
aaaaatggcg atthcaataa tggthtattg tgctggaact tgaaagggca tgtagatgta 2940
gaagaacaaa acaaccatcg thcagtcctt gthgtcccgb aatgggaagc agaggtgtcc 3000
30 caagaagthc gthgtctgtcc aggtcgtggc tatatccttc gthgttacagc gtacaaagag 3060
ggatatggag agggctgcbg aaccatccat gagatcgaag acaatacaga cgaactgaaa 3120
35 thcagcaact gthgtagaaga ggaagtatat ccaaacaaac cggtaacgbg taatgattat 3180
actgcbgactc aagaagaata tgagggtagc tacactthc gtaatcgbg atatgacgga 3240
gcctatgaaa gcaattcttc thgtaccagct gattatgcat cagcctatga agaaaaagcbg 3300
40 tatacagatg gaagaagaga gaatcctthg gaatctaata gaggatatgg ggattacgbg 3360
ccactaccag ctggthtatg gacaaaggaa thtagagtact thccagaaac cgataaggta 3420
45 tggattgaga thcgagaaac ggaaggaaac thcattgthg atagthgthgaa atthctcctt 3480
atggaggaat aa 3492

50 <210> 4
<211> 1163
<212> Білок
<213> Bacillus thuringiensis

55 <400> 4

Met Glu Gly Asn Asn Leu Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser
1 5 10 15

60 Asn Pro Lys Asp Ile Ile Leu Gly Asp Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn

UA 124757 C2

5	Thr	Val	Ala	Asp	Ile	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Phe	Ser	Glu
			35					40					45			
10	Phe	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Phe	Ile	Leu	Gly	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Trp
		50					55					60				
15	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Ser	Gln	Trp	Asp	Leu	Phe	Leu	Glu	Gln	Ile	Glu
	65					70					75					80
20	Gln	Leu	Ile	Lys	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Ile
					85					90					95	
25	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Ala	Arg	Ala
				100					105					110		
30	Phe	Ser	Asp	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Glu
			115					120					125			
35	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Ile	Ile	Thr	Ala	Leu
	130						135					140				
40	Pro	Leu	Phe	Arg	Val	Gln	Asn	Tyr	Glu	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr
	145					150					155					160
45	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Ile	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	Val
					165					170					175	
50	Phe	Gly	Glu	Arg	Trp	Gly	Tyr	Asp	Thr	Ala	Thr	Ile	Asn	Asn	Arg	Tyr
				180					185					190		
55	Ser	Asp	Leu	Thr	Ser	Leu	Ile	His	Val	Tyr	Thr	Asn	His	Cys	Val	Asp
			195					200					205			
60	Thr	Tyr	Asn	Gln	Gly	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Gly	Arg	Phe	Leu	Thr	Asp
		210					215					220				
65	Trp	Ile	Val	Tyr	Asn	Arg	Phe	Arg	Arg	Gln	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu
	225					230					235					240
70	Asp	Ile	Val	Ala	Phe	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ile	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ile
					245					250					255	
75	Gln	Thr	Ala	Thr	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Leu	Asp	Leu	Pro	Phe
				260					265					270		

UA 124757 C2

5 Ile Asn Glu Asn Leu Ser Pro Ala Ala Ser Tyr Pro Ser Phe Ser Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Ser Pro His Leu Val Asp Phe Leu Asn
 290 295 300
 10 Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Leu Tyr Trp Gly
 305 310 315 320
 15 Gly His Arg Val Asn Phe Thr Arg Ser Gly Val Thr Thr Phe Ile Gln
 325 330 335
 20 Ser Pro Leu Tyr Gly Arg Glu Gly Asn Ala Glu Arg Ser Val Ile Ile
 340 345 350
 25 Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Ile Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Val Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Asn Ala Asn Pro Val Ala Gly Ile Glu Gly Val Glu Phe
 370 375 380
 30 Gln Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ile Tyr Arg Lys Ser Gly Pro Ile Asp
 385 390 395 400
 35 Ser Phe Asn Glu Leu Pro Pro Gln Asp Ala Ser Val Ser Pro Ser Ile
 405 410 415
 40 Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Leu Glu Arg Ile Ser
 420 425 430
 45 Gly Pro Arg Ile Ala Gly Val Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala
 435 440 445
 Ser Pro Thr Asn Glu Val Ser Ser Ser Arg Ile Thr Gln Ile Pro Trp
 450 455 460
 50 Val Lys Ala His Thr Leu Ala Ser Gly Ala Ser Val Ile Lys Gly Pro
 465 470 475 480
 55 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Thr Arg Asn Thr Leu Gly Glu Leu
 485 490 495
 60 Gly Thr Leu Arg Val Thr Phe Ala Gly Arg Leu Ser Gln Ser Tyr Tyr
 500 505 510

UA 124757 C2

Ile Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Val Ala Asn Arg Ser Gly Ile Phe Ser
515 520 525

5 Tyr Ser Gln Pro Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Pro Lys Thr Met Asp
530 535 540

10 Ala Asp Glu Ser Leu Thr Ser Arg Ser Phe Ala Leu Ala Thr Leu Ala
545 550 555 560

15 Thr Pro Leu Thr Phe Arg Arg Gln Glu Glu Leu Asn Leu Gln Ile Pro
565 570 575

20 Ser Gly Thr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Val Asp Glu Thr
580 585 590

25 Phe Thr Thr Glu Ser Asp Leu Asp Arg Ala Gln Gln Ala Val Asn Ala
595 600 605

30 Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp
610 615 620

35 Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu
625 630 635 640

40 Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala
645 650 655

45 Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg
660 665 670

50 Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile
675 680 685

55 Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu
690 695 700

60 Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile
705 710 715 720

65 Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr
725 730 735

70 Ile Gly Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala
740 745 750

UA 124757 C2

Lys His Glu Ile Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Thr Leu
 755 760 765
 5 Ser Val Glu Asn Ser Ile Gly Pro Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala
 770 775 780
 10 Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asn Leu Glu Cys Ser Cys Arg Glu Gly
 785 790 795 800
 15 Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val
 805 810 815
 20 Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Ala Ile Phe Lys
 820 825 830
 25 Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu
 835 840 845
 30 Glu Glu Lys Pro Leu Leu Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala
 850 855 860
 35 Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn
 865 870 875 880
 40 Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn
 885 890 895
 45 Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His
 900 905 910
 50 Ala Ala Asp Lys Arg Val His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu
 915 920 925
 55 Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Gly Ile Phe Glu Glu Leu Glu
 930 935 940
 60 Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile
 945 950 955 960
 65 Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Leu Cys Trp Asn Leu Lys Gly
 965 970 975
 70 His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val
 980 985 990
 75 Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly

UA 124757 C2

	995	1000	1005	
5	Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly 1010	1015	1020	
10	Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asp Asn Thr Asp Glu 1025	1030	1035	
15	Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn 1040	1045	1050	
20	Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu 1055	1060	1065	
25	Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu 1070	1075	1080	
30	Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu 1085	1090	1095	
35	Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Glu Asn Pro Cys Glu Ser Asn 1100	1105	1110	
40	Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ala Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr 1115	1120	1125	
45	Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu 1130	1135	1140	
50	Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu 1145	1150	1155	
55	Leu Leu Met Glu Glu 1160			
60	<210> 5 <211> 2259 <212> ДНК <213> Штучна послідовність			
65	<220> <223> варіант MP589FL			
70	<400> 5 atggaaggca acaacctgaa ccagtgacatt ccgtataact gcctgagcaa cccgaaagat			60
75	attattctgg gcgatgaacg tctggaaacc ggcaacaccg tggcggatat taccctgggc			120
80	attgtgaacc tgctgtttag cgaatttggtg ccgggcggcg gctttattct gggcctgctg			180

UA 124757 C2

	gatctgattt	ggggcagcat	tggccgtagc	cagtgggatc	tgtttctgga	acagattgaa	240
	cagctgatta	aacagcgtat	tgaagaatth	gcgcgtaacc	aggcgattag	ccgtctggaa	300
5	ggcctgagcg	atctgtataa	aacctatgcg	cgtgcgttta	gcgattggga	agcggatccg	360
	accaaccg	cgctgcgtga	agaaatgcgt	attcagttta	acgatatgaa	cagcgcgatt	420
10	attaccg	tgccgctg	tcgtgtgcag	aactatgaag	tggcgctgct	gagcgtgtat	480
	gtgcaggc	cgaacctgca	tctgagcatt	ctgcgtgatg	tgagcgtg	tggcgaacgt	540
	tggggctatg	ataccg	cattaacaac	cgttatagcg	atctgaccag	cctgattcat	600
15	gtgtatacca	accattg	ggatacctat	aaccagggcc	tgcgtcgtct	ggaaggccgt	660
	tttctgaccg	attggattgt	gtataaccgt	tttcgtcgtc	agctgaccat	tagcgtgctg	720
20	gatattgtgg	cgthttttcc	gaactatgat	attcgtacct	atccgattca	gaccg	780
	cagctgacc	gtgaagtgta	tctggatctg	ccgthttatta	acgaaaacct	gagcccggcg	840
	gcgagctatc	cgacctttag	gcggcgga	agcgcgatta	ttcgtagccc	gcatctggtg	900
25	gathttctga	acagctttac	catttatacc	gatagcctgg	cgcgthtatgc	gtattggggc	960
	ggccatctgg	tgaacagctt	tcgtaccggc	accaccacca	acctgattcg	tagcccgtg	1020
30	tatggccgtg	aaggcaacac	cgaacgtccg	gtgaccatta	ccgcgagccc	gagcgtgccg	1080
	athtttcgta	cctgagcta	tattaccggc	ctggataaca	gcaaccggg	ggcgggcatt	1140
	gaaggcgtgg	aatttcagaa	caccattagc	cgtagcattt	atcgtaaaag	cggcccgatt	1200
35	gatagcttta	gcgaactgcc	gccgcaggat	gcgagcgtga	gcccggcgat	tggctatagc	1260
	catcgtctgt	gcatg	ctttctggaa	cgtattagcg	gcccgcgtat	tgcgggcacc	1320
40	gtgttttagct	ggacctatcg	tagcgcgagc	ccgaccaacg	aagtgagccc	gagccgtatt	1380
	accagattc	cgtgggtgaa	agcgcatacc	ctggcgagcg	gcgcgagcgt	gattaaaggc	1440
	ccgggcttta	ccggcg	tattctgacc	cgtaacagca	tgggcgaact	gggcaccctg	1500
45	cgtgtgacct	ttaccggccg	tctgccgag	agctattata	ttcgthtttcg	ttatgcgagc	1560
	gtggcgaacc	gtagcggcac	ctttcgthtat	agccagccgc	cgagctatgg	cattagcttt	1620
50	ccgaaaacca	tggatgcggg	cgaaccgctg	accagccgta	gctttgcgca	taccaccctg	1680
	tttacc	ttacctttag	ccgtgcgag	gaagaatthg	atctgtatat	tcagagcggc	1740
	gtgtatattg	atcgtattga	atthattccg	gtgaccg	cctthgaagc	ggaatatgat	1800
55	ctggaacgtg	cgcagaaagt	ggtgaacg	ctgthttacca	gcaccaacca	gctgggctg	1860
	aaaaccgatg	tgaccgatta	tcatattgat	caggtgagca	acctgg	gtgcctgagc	1920
60	gatgaattht	gcctggatga	aaaacgtgaa	ctgagc	aagtgaaaca	tgcgaaacgt	1980

UA 124757 C2

ctgagcgatg aacgtaacct gctgcaggat ccgaactttc gtggcattaa ccgtcagccg 2040
gatcgtggct ggcgtggcag caccgatatt accattcagg gcggcgatga tgtgtttaa 2100
5 gaaaactatg tgaccctgcc gggcaccttt gatgaatgct atccgaccta tctgtatcag 2160
aaaattgatg aaagcaaact gaaagcgtat acccgttatc agctgcgtgg ctatattgaa 2220
gatagccagg atctggaaat ttatctgatt cgttataac 2259
10

<210> 6

<211> 753

<212> Білок

15 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіант MP589FL

20 <400> 6

Met Glu Gly Asn Asn Leu Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser
1 5 10 15

25

Asn Pro Lys Asp Ile Ile Leu Gly Asp Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
20 25 30

30

Thr Val Ala Asp Ile Thr Leu Gly Ile Val Asn Leu Leu Phe Ser Glu
35 40 45

35

Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Leu Gly Leu Leu Asp Leu Ile Trp
50 55 60

40

Gly Ser Ile Gly Arg Ser Gln Trp Asp Leu Phe Leu Glu Gln Ile Glu
65 70 75 80

Gln Leu Ile Lys Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile
85 90 95

45

Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Tyr Ala Arg Ala
100 105 110

50

Phe Ser Asp Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu
115 120 125

55

Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Ile Ile Thr Ala Leu
130 135 140

60

Pro Leu Phe Arg Val Gln Asn Tyr Glu Val Ala Leu Leu Ser Val Tyr
145 150 155 160

UA 124757 C2

Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val
165 170 175

5 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Tyr Asp Thr Ala Thr Ile Asn Asn Arg Tyr
180 185 190

10 Ser Asp Leu Thr Ser Leu Ile His Val Tyr Thr Asn His Cys Val Asp
195 200 205

15 Thr Tyr Asn Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Gly Arg Phe Leu Thr Asp
210 215 220

20 Trp Ile Val Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Gln Leu Thr Ile Ser Val Leu
225 230 235 240

25 Asp Ile Val Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile
245 250 255

30 Gln Thr Ala Thr Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Leu Asp Leu Pro Phe
260 265 270

35 Ile Asn Glu Asn Leu Ser Pro Ala Ala Ser Tyr Pro Thr Phe Ser Ala
275 280 285

40 Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Ser Pro His Leu Val Asp Phe Leu Asn
290 295 300

45 Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Ala Tyr Trp Gly
305 310 315 320

50 Gly His Leu Val Asn Ser Phe Arg Thr Gly Thr Thr Thr Asn Leu Ile
325 330 335

55 Arg Ser Pro Leu Tyr Gly Arg Glu Gly Asn Thr Glu Arg Pro Val Thr
340 345 350

60 Ile Thr Ala Ser Pro Ser Val Pro Ile Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Ile
355 360 365

65 Thr Gly Leu Asp Asn Ser Asn Pro Val Ala Gly Ile Glu Gly Val Glu
370 375 380

70 Phe Gln Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ile Tyr Arg Lys Ser Gly Pro Ile
385 390 395 400

75 Asp Ser Phe Ser Glu Leu Pro Pro Gln Asp Ala Ser Val Ser Pro Ala

UA 124757 C2

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
 660 665 670
 5
 Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
 675 680 685
 10
 Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 690 695 700
 15
 Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 705 710 715 720
 20
 Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 725 730 735
 25
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 740 745 750
 Asn
 30
 <210> 7
 <211> 2259
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> варіант MP589FL
 <400> 7
 40 atggaaggca acaacctgaa ccagtgcat cgtataact gcctgaccaa cccgaaagat 60
 attattctgg gcgatgaacg tctggaaacc ggcaacaccg tggcggatat taccctgggc 120
 attgtgaacc tgctgtttac cgaatttggt cggggcggcg gctttattct gggcctgctg 180
 45 gatgtgattt ggggcagcat tggccgtagc cagtgggaac tgtttctgga acagattgaa 240
 cagctgatta aacagcgtat tgaagaattt gcgcgtaacc aggcgattag ccgtctggaa 300
 50 ggcctgagcg atctgtataa aacctatgcg cgtgcgttta gcgattggga agcggatccg 360
 accaaccgcg cgctgcgtga agaatgcgt attcagttta acgatatgaa cagcgcgatt 420
 attaccgcbc tgccgctggt tcgtgtgcag aactatgaag tggcgtgct gagcgtgtat 480
 55 gtgcaggcgg cgaacctgca tctgagcatt ctgcgtgatg tgagcgtggt tggcgaacgt 540
 tggggctatg ataccgcgac cattaacaac cgttatagcg atctgaccag cctgattcat 600
 60 gtgtatacca accattgcgt ggatacctat aaccagggcc tgcgtcgtct ggaaggccgt 660

UA 124757 C2

	tttctgaccg attggattgt gtataaccgt tttcgtcgtc agctgaccat tagcgtgctg	720
	gatattgtgg cgTTTTTtcc gaactatgat attcgtacct atccgattca gaccgcgacc	780
5	cagctgaccg gtgaagtgta tctggatctg cggTTtatta acgaaaacct gagccccggcg	840
	gcgagctatc cgacctttag cgcggcggaa agcgcgatta ttcgtagccc gcatctggtg	900
10	gattttctga acagctttac catttatacc gatagcctgg cgcgTtatgc gtattggggc	960
	ggccatctgg tgaacagctt tcgtaccggc accaccacca acctgattcg tagcccgctg	1020
	tatggccgtg aaggcaacac cgaacgtccg gtgaccatta ccgcgagccc gagcgtgccg	1080
15	atTTTTcgta ccttgagcta tattaccggc ctggataaca gcaacctcggg ggcgggcatt	1140
	gaaggcgtgg aatttcagaa caccattagc cgtagcattt atcgtaaaag cggccccgatt	1200
20	gatagcttta gcgaactgcc gccgcaggat gcgagcgtga gcccggcgat tggctatagc	1260
	catcgtctgt gccatgcgac ctttctggaa cgtattagcg gcccgcgat tgcgggcacc	1320
	gtgttttagct ggacctatcg tagcgcgagc ccgaccaacg aagtgagccc gagccgtatt	1380
25	accagattc cgtgggtgaa agcgcatacc ctggcgagcg gcgcgagcgt gattaaaggc	1440
	ccgggcttta ccggcggcga tattctgacc cgtaacagca tgggcgaact gggcacctg	1500
30	cgtgtgagct ttaccggccg tctgccgag agctattata ttcgTTTTcg ttatgcgagc	1560
	gtggcgaacc gtaccggcac ctttcgttat agccagccgc cgagctatgg cctgagcttt	1620
	ccgaaaacca tggatgcggg cgaaccgctg accagccgta gctttgcgca taccacctg	1680
35	tttacccca ttaccttag ccgtgcgag gaagaatttg atctgtatat tcagagcggc	1740
	gtgtatattg atcgtattga atttattccg gtgaccgca ctttgaagc ggaatatgat	1800
40	ctggaacgtg cgcagaaagt ggtgaacgcg ctgTTTacca gcaccaacca gctgggcctg	1860
	aaaaccgatg tgaccgatta tcatattgat caggtgagca acctggtggc gtgcctgagc	1920
	gatgaatttt gcctggatga aaaacgtgaa ctgagcgaaa aagtgaaaca tgcgaaacgt	1980
45	ctgagcgatg aacgtaacct gctgcaggat ccgaactttc gtggcattaa ccgtcagccg	2040
	gatcgtggct ggcgtggcag caccgatatt accattcagg gcggcgatga tgtgtttaa	2100
50	gaaaactatg tgacctgcc gggcaccttt gatgaatgct atccgacct tctgtatcag	2160
	aaaattgatg aaagcaact gaaagcgtat acccgTtatc agctgcgtgg ctatattgaa	2220
	gatagccagg atctggaat ttatctgatt cgttataac	2259
55	<210> 8	
	<211> 753	
	<212> Білок	
	<213> Штучна послідовність	
60	<220>	

UA 124757 C2

<223> вариант MP589FL

<400> 8

5 Met Glu Gly Asn Asn Leu Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Thr
 1 5 10 15

10 Asn Pro Lys Asp Ile Ile Leu Gly Asp Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
 20 25 30

15 Thr Val Ala Asp Ile Thr Leu Gly Ile Val Asn Leu Leu Phe Thr Glu
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Leu Gly Leu Leu Asp Val Ile Trp
 50 55 60

20 Gly Ser Ile Gly Arg Ser Gln Trp Glu Leu Phe Leu Glu Gln Ile Glu
 65 70 75 80

25 Gln Leu Ile Lys Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile
 85 90 95

30 Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Tyr Ala Arg Ala
 100 105 110

35 Phe Ser Asp Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu
 115 120 125

40 Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Ile Ile Thr Ala Leu
 130 135 140

Pro Leu Phe Arg Val Gln Asn Tyr Glu Val Ala Leu Leu Ser Val Tyr
 145 150 155 160

45 Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val
 165 170 175

50 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Tyr Asp Thr Ala Thr Ile Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190

55 Ser Asp Leu Thr Ser Leu Ile His Val Tyr Thr Asn His Cys Val Asp
 195 200 205

60 Thr Tyr Asn Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Gly Arg Phe Leu Thr Asp
 210 215 220

Trp Ile Val Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Gln Leu Thr Ile Ser Val Leu

UA 124757 C2

	225				230					235				240		
5	Asp	Ile	Val	Ala	Phe	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ile	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ile
					245					250					255	
10	Gln	Thr	Ala	Thr	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Leu	Pro	Phe
				260					265					270		
15	Ile	Asn	Glu	Asn	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ser	Ala
			275					280					285			
20	Ala	Glu	Ser	Ala	Ile	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Val	Asp	Phe	Leu	Asn
		290					295					300				
25	Ser	Phe	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asp	Ser	Leu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Gly
	305					310					315					320
30	Gly	His	Leu	Val	Asn	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Asn	Leu	Ile
					325					330					335	
35	Arg	Ser	Pro	Leu	Tyr	Gly	Arg	Glu	Gly	Asn	Thr	Glu	Arg	Pro	Val	Thr
				340					345					350		
40	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Tyr	Ile
			355					360					365			
45	Thr	Gly	Leu	Asp	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Gly	Val	Glu
		370					375					380				
50	Phe	Gln	Asn	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Ile	Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Pro	Ile
	385					390					395					400
55	Asp	Ser	Phe	Ser	Glu	Leu	Pro	Pro	Gln	Asp	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	Ala
				405						410					415	
60	Ile	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ala	Thr	Phe	Leu	Glu	Arg	Ile
				420					425					430		
65	Ser	Gly	Pro	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Val	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser
			435					440					445			
70	Ala	Ser	Pro	Thr	Asn	Glu	Val	Ser	Pro	Ser	Arg	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro
		450					455					460				
75	Trp	Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Ile	Lys	Gly
	465					470					475					480

UA 124757 C2

5 Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Thr Arg Asn Ser Met Gly Glu
 485 490 495

10 Leu Gly Thr Leu Arg Val Ser Phe Thr Gly Arg Leu Pro Gln Ser Tyr
 500 505 510

15 Tyr Ile Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Val Ala Asn Arg Thr Gly Thr Phe
 515 520 525

20 Arg Tyr Ser Gln Pro Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Phe Pro Lys Thr Met
 530 535 540

25 Asp Ala Gly Glu Pro Leu Thr Ser Arg Ser Phe Ala His Thr Thr Leu
 545 550 555 560

30 Phe Thr Pro Ile Thr Phe Ser Arg Ala Gln Glu Glu Phe Asp Leu Tyr
 565 570 575

35 Ile Gln Ser Gly Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Ile Pro Val Thr
 580 585 590

40 Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Val Val
 595 600 605

45 Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asp Val
 610 615 620

50 Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Ala Cys Leu Ser
 625 630 635 640

55 Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
 645 650 655

60 His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
 660 665 670

65 Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
 675 680 685

70 Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 690 695 700

75 Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 705 710 715 720

UA 124757 C2

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 725 730 735

5

Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 740 745 750

10 Asn

<210> 9
 15 <211> 2259
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 20 <223> варіант MP589FL

<400> 9
 atggaaggca acaacctgaa ccagtgacatt ccgtataact gcctgaccaa cccgaaagat 60
 25 attattctgg gcgatgaacg tctggaaacc ggcaacaccg tggcggatat taccctgggc 120
 attgtgaacc tgctgtttac cgaatttggt cggggcggcg gctttattct gggcctgctg 180
 gatgtgattt ggggcagcat tggccgtagc cagtgggaac tgtttctgga acagattgaa 240
 30 cagctgatta aacagcgtat tgatgatttt gcgcgtaacc aggcgattag ccgtctggaa 300
 ggcctgagcg atctgtataa aacctatgcg cgtgctgctta gcgattggga agcggatccg 360
 35 accaaccgcg cgtgctgga agaaatgctg attcagttta acgatatgaa cagcgcgatt 420
 attaccgctg tgccgctggt tcgtgtgcag aactatgaag tggcgtgctg gagcgtggtat 480
 gtgcaggcgg cgaacctgca tctgagcatt ctgctgtagt tgagcgtggt tggcgaacgt 540
 40 tggggctatg ataccgctgac cattaacaac cgttatagcg atctgaccag cctgattcat 600
 gtgtatacca accattgctg ggatacctat aaccagggcc tgcgtcgtct ggaaggccgt 660
 45 tttctgaccg attggattgt gtataaccgt tttcgtcgtc agctgaccat tagcgtgctg 720
 gatattgtgg cgttttttcc gaactatgat attcgtacct atccgattca gaccgagacc 780
 cagctgacct gtgaagtgta tctggatctg ccgtttatta acgaaaacct gagcccggcg 840
 50 gcgagctatc cgaccttag cgcgccgga agcgcgatta ttcgtagccc gcatctggtg 900
 gatatttatta acagctttac cattataacc gatagcctgg cgcgttatgc gtattggggc 960
 55 ggccatctgg tgaacagctt tcgtaccggc accaccacca acctgattcg tagcccgtg 1020
 tatggccgtg aaggcaacac cgaacgtccg gtgaccatta ccgagagccc gagcgtgccc 1080
 atttttcgta ccctgagcta tattaccggc ctggataaca gcaaccgggt ggcgggcatt 1140
 60 gaaggcgtgg aatttcagaa caccattagc cgtagcattt atcgtaaaag cggcccgtg 1200

gatagcttta gcgaactgcc gccgcaggat gcgagcgtga gcccggcgat tggctatagc 1260
 5 catcgtctgt gccatgcbgac ctttctggaa cgtattagcg gcccgcgat tgcbgggcacc 1320
 gtgttttagct ggaccatcg tagcbgcbgac cbgaccaacg aagtgbgccc gagcbgctatt 1380
 acccbgattc cbgtgggtgaa agcbgcbatacc ctggcbgcbgcbg gcgcbgcbgcbg gattaaagbc 1440
 10 ccbggcbcttta ccbggcbgcbg tattctgacc cbgtaacagcb tgggbcbgaact gggcbcbcbctg 1500
 cbgtgbgcbgcbg ttaccbggcbg tctgcbgcbgcbg agctattata ttcgbttttcbg ttatgbgcbgcbg 1560
 gtggcbgaacc gtaccbggcbg ctttcbgcttat agcbgcbgcbgcbg cbgagcbtatgg cbtgbgcbcttt 1620
 15 ccbgaaacba tggbatgbgcbg cbgaaccgbtgb acccbgcbgta gcbtttgbgcbg taccaccbctg 1680
 tttaccccbg ttaccttttag cbggbgcbgcbg gaagaatttg atctgbtatat tcbgagcbgcbg 1740
 20 gtgbtatattg atcbgattga atttattcbg gtgaccgbgcbg cctttgaagcb ggaatatgat 1800
 cbtggaacgbtgb cbgcbgaagb ggbtgaacgbgcb cbgtttacca gcbaccaacba gcbtgggbcbctg 1860
 aaaaccgbatg tgbaccgatta tcbatattgat cbggbtgbgcbg acbtggbtggcb gtbcbctgbgcbg 1920
 25 gatgaatttt gcbctgbgatga aaaacbtgba cbtgbgcbgaaa aagtgaaacba tgbgbaaacbtg 1980
 cbtgbgcbgatg aacgbtaacct gcbtgbcbgcbg cbggaactttc gtbggcbatba ccbtcbgcbgcbg 2040
 30 gatcbtggcbtgb ggbcbtggcbg cbcbcbgatatt accattcbgcbg cbggbcbgatga tgbtgbttaaa 2100
 gbaaaactatg tgbaccctgcbg ggbcbcbcttt gatgaatgbt atcbgcbcbt tctgbtatcbg 2160
 aaaattgbatg aaagcbaaact gaagcbgcbtat accbgttatcb agcbtgbcbtgg cbtatattgaa 2220
 35 gatagcbcbgcbg atcbtgbbaat ttatctgbatt cbgttataac 2259

40 <210> 10
 <211> 753
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> варіант MP589FL

<400> 10

50 Met Glu Gly Asn Asn Leu Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Thr
 1 5 10 15

55 Asn Pro Lys Asp Ile Ile Leu Gly Asp Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
 20 25 30

Thr Val Ala Asp Ile Thr Leu Gly Ile Val Asn Leu Leu Phe Thr Glu
 35 40 45

60 Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Leu Gly Leu Leu Asp Val Ile Trp

UA 124757 C2

	50					55						60				
5	Gly 65	Ser	Ile	Gly	Arg	Ser 70	Gln	Trp	Glu	Leu	Phe 75	Leu	Glu	Gln	Ile	Glu 80
10	Gln	Leu	Ile	Lys	Gln 85	Arg	Ile	Asp	Asp	Phe 90	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Ile 95
15	Ser	Arg	Leu	Glu 100	Gly	Leu	Ser	Asp	Leu 105	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Ala	Arg	Ala 110
20	Phe	Ser	Asp 115	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro 120	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Glu 125
25	Met	Arg 130	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp 135	Met	Asn	Ser	Ala	Ile	Ile	Thr	Ala	Leu 140
30	Pro	Leu	Phe	Arg	Val	Gln 150	Asn	Tyr	Glu	Val	Ala 155	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr 160
35	Val	Gln	Ala	Ala	Asn 165	Leu	His	Leu	Ser	Ile 170	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	Val 175
40	Phe	Gly	Glu	Arg 180	Trp	Gly	Tyr	Asp	Thr 185	Ala	Thr	Ile	Asn	Asn	Arg	Tyr 190
45	Ser	Asp	Leu 195	Thr	Ser	Leu	Ile	His 200	Val	Tyr	Thr	Asn	His	Cys	Val	Asp 205
50	Thr	Tyr 210	Asn	Gln	Gly	Leu	Arg	Arg 215	Leu	Glu	Gly	Arg 220	Phe	Leu	Thr	Asp
55	Trp	Ile	Val	Tyr	Asn	Arg 230	Phe	Arg	Arg	Gln	Leu 235	Thr	Ile	Ser	Val	Leu 240
60	Asp	Ile	Val	Ala	Phe 245	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp 250	Ile	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ile 255
65	Gln	Thr	Ala	Thr 260	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val 265	Tyr	Leu	Asp	Leu	Pro	Phe 270
70	Ile	Asn	Glu 275	Asn	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala 280	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ser	Ala 285
75	Ala	Glu 290	Ser	Ala	Ile	Ile	Arg	Ser 295	Pro	His	Leu	Val	Asp	Phe	Ile	Asn 300

UA 124757 C2

5 Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Ala Tyr Trp Gly
 305 310 315 320
 Gly His Leu Val Asn Ser Phe Arg Thr Gly Thr Thr Thr Asn Leu Ile
 325 330 335
 10 Arg Ser Pro Leu Tyr Gly Arg Glu Gly Asn Thr Glu Arg Pro Val Thr
 340 345 350
 15 Ile Thr Ala Ser Pro Ser Val Pro Ile Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Ile
 355 360 365
 20 Thr Gly Leu Asp Asn Ser Asn Pro Val Ala Gly Ile Glu Gly Val Glu
 370 375 380
 25 Phe Gln Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ile Tyr Arg Lys Ser Gly Pro Ile
 385 390 395 400
 Asp Ser Phe Ser Glu Leu Pro Pro Gln Asp Ala Ser Val Ser Pro Ala
 405 410 415
 30 Ile Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Leu Glu Arg Ile
 420 425 430
 35 Ser Gly Pro Arg Ile Ala Gly Thr Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser
 435 440 445
 40 Ala Ser Pro Thr Asn Glu Val Ser Pro Ser Arg Ile Thr Gln Ile Pro
 450 455 460
 45 Trp Val Lys Ala His Thr Leu Ala Ser Gly Ala Ser Val Ile Lys Gly
 465 470 475 480
 Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Thr Arg Asn Ser Met Gly Glu
 485 490 495
 50 Leu Gly Thr Leu Arg Val Ser Phe Thr Gly Arg Leu Pro Gln Ser Tyr
 500 505 510
 55 Tyr Ile Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Val Ala Asn Arg Thr Gly Thr Phe
 515 520 525
 60 Arg Tyr Ser Gln Pro Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Phe Pro Lys Thr Met
 530 535 540

UA 124757 C2

Asp Ala Gly Glu Pro Leu Thr Ser Arg Ser Phe Ala His Thr Thr Leu
 545 550 555 560
 5
 Phe Thr Pro Ile Thr Phe Ser Arg Ala Gln Glu Glu Phe Asp Leu Tyr
 565 570 575
 10
 Ile Gln Ser Gly Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Ile Pro Val Thr
 580 585 590
 15
 Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Val Val
 595 600 605
 20
 Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asp Val
 610 615 620
 25
 Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Ala Cys Leu Ser
 625 630 635 640
 30
 His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
 660 665 670
 35
 Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
 675 680 685
 40
 Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 690 695 700
 45
 Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 705 710 715 720
 50
 Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 725 730 735
 55
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 740 745 750
 Asn

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, вибрана із групи, що складається з:
 (а) молекули нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що
 60 складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, або
 комплементарну їй послідовність повної довжини;

- (b) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10;
- 5 (c) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10; та
- (d) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, де вказаний білок є біологічно активним варіантом білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і послідовність вказаного варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 2 1-3 амінокислотними залишками.
- 10 2. Виділена молекула нуклеїнової кислоти за п. 1, де вказана нуклеотидна послідовність являє собою синтетичну послідовність, що була сконструйована для експресії в рослині.
3. ДНК-конструкція, яка містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.
- 15 4. ДНК-конструкція за п. 3, яка додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує гетерологічний поліпептид.
5. Клітина-хазяїн, яка містить ДНК-конструкцію за п. 3.
6. Клітина-хазяїн за п. 5, яка являє собою бактеріальну клітину.
7. Клітина-хазяїн за п. 5, яка являє собою рослинну клітину.
- 20 8. Трансгенна рослина, яка містить клітину-хазяїна за п. 7.
9. Трансгенна рослина за п. 8, де вказана рослина вибрана з групи, що складається з маїсу, сорго, пшениці, капусти, соняшника, томата, хрестоцвітних, різновидів перцю, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряка, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного ріпаку.
10. Трансформована насінина рослини за п. 9, де насінина містить ДНК-конструкцію.
- 25 11. Виділений поліпептид, вибраний із групи, що складається з:
- (a) поліпептиду, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10;
- (b) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9;
- 30 (c) послідовності поліпептиду, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10; та
- (d) біологічно активного варіанта білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і послідовність вказаного варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 2 1-3 амінокислотними залишками.
- 35 12. Інсектицидна композиція, яка містить поліпептид за п. 11.
13. Композиція за п. 12, де вказана композиція вибрана з групи, що складається з порошку, дусту, пелети, гранули, розпилюваного розчину, емульсії, колоїдної речовини та розчину.
14. Композиція за п. 13, де вказана композиція одержана шляхом висушування, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин *Bacillus thuringiensis*.
- 40 15. Композиція за п. 13, яка містить від 1 до 99 % за вагою вказаного поліпептиду.
16. Спосіб контролю популяції лускокрилого або твердокрилого шкідника, який передбачає згодовування вказаній популяції пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 11.
- 45 17. Спосіб знищення лускокрилого шкідника, який передбачає згодовування вказаному шкіднику пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 11.
18. Спосіб одержання поліпептиду з пестицидною активністю, який передбачає культивування клітини-хазяїна за п. 5 в умовах, за яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, причому вказаний поліпептид вибраний із групи, що складається з:
- 50 (a) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, або комплементарною їй послідовністю повної довжини;
- (b) поліпептиду, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10;
- 55 (c) послідовності поліпептиду, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10, де поліпептид має інсектицидну активність; та
- (d) біологічно активного варіанта білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і послідовність вказаного варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 2 1-3 амінокислотними залишками.
- 60

19. Рослина зі стабільно вбудованою в її геном ДНК-конструкцією, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який має пестицидну активність, де вказана нуклеотидна послідовність вибрана з групи, що складається з:

5 (a) молекули нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, або комплементарну їй послідовність повної довжини;

(b) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10;

10 (c) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10; та

15 (d) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, де вказаний білок є біологічно активним варіантом білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і послідовність вказаного варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 2 1-3 амінокислотними залишками,

20 де поліпептид має інсектицидну активність; де вказана нуклеотидна послідовність функціонально пов'язана з промотором, який керує експресією кодувальної послідовності в рослинній клітині.

20. Рослина за п. 19, де вказана рослина являє собою рослинну клітину.

21. Спосіб захисту рослини від лускокрилого шкідника, який передбачає введення у вказану рослину або її клітину щонайменше одного вектора експресії, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує пестицидний поліпептид, де вказана рослина продукує згаданий пестицидний поліпептид, що має інсектицидну активність щодо лускокрилого шкідника, і де вказана нуклеотидна послідовність вибрана з групи, що складається з:

25 (a) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 9, або комплементарну їй послідовність повної довжини;

30 (b) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10;

35 (c) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 та SEQ ID NO: 10; та

40 (d) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, де вказаний білок є біологічно активним варіантом білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і послідовність вказаного варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 2 1-3 амінокислотними залишками.