



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2015127989, 11.12.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

13.12.2012 US 61/736,947;

13.03.2013 US 13/800,447

(43) Дата публикации заявки: 19.01.2017 Бюл. № 02

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.07.2015

(86) Заявка РСТ:

US 2013/074379 (11.12.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2014/093485 (19.06.2014)

Адрес для переписки:

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

(71) Заявитель(и):

**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕД ИНТЕРНЭШНЛ,  
ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ЧО Миёнг-Дзе (US),****ЭЛЛИС Сэмьюэл Р. (US),****ГОРДОН-КЭММ Уилльям Дж. (US),****ЧЖАО Зуо-Ю (US)**

## (54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ОТБОРА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

## (57) Формула изобретения

1. Полинуклеотидная конструкция, содержащая:

а) эксцизионную кассету, представляющую собой эксцизионную кассету А (ЕС<sub>А</sub>),

содержащую:

i) кодирующий полинуклеотид А (СР<sub>А</sub>), который кодирует сайт-специфичную

рекомбиназу; и

ii) индуцируемый промотор А (Р<sub>А</sub>), функционально связанный с СР<sub>А</sub>;

b) первый и второй сайты рекомбинации, фланкирующие эксцизионную кассету;

c) кодирующий полинуклеотид В (СР<sub>В</sub>), который кодирует полипептид толерантности

к гербицидам; и

d) промотор В (Р<sub>В</sub>), где Р<sub>В</sub> функционально связан с СР<sub>В</sub> после вырезания эксцизионной кассеты.2. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где индуцируемый промотор Р<sub>А</sub> выбран из группы, состоящей из индуцируемого стрессом промотора и химически индуцируемого промотора.

3. Полинуклеотидная конструкция по п. 2, где указанный химически индуцируемый промотор представляет собой промотор, содержащий tet-оператор.

4. Полинуклеотидная конструкция по п. 3, где указанная полинуклеотидная

конструкция дополнительно содержит кодирующий полинуклеотид F (CP<sub>F</sub>), который кодирует чувствительный к сульфонилмочевине транскрипционный белок-репрессор, где указанный CP<sub>F</sub> функционально связан с промотором, активным в растительной клетке.

5. Полинуклеотидная конструкция по п. 2, где индуцируемый стрессом промотор может индуцироваться в ответ на холод, засуху, сильную засоленность, десикацию или их комбинацию.

6. Полинуклеотидная конструкция по п. 2, где индуцируемый стрессом промотор содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) нуклеотидной последовательности, имеющей последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 18;
- b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 18;
- c) нуклеотидной последовательности, содержащей по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 18;
- d) нуклеотидной последовательности, изложенной как нуклеотиды 291-430 из SEQ ID NO: 18; и
- e) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной последовательности, изложенной как нуклеотиды 291-430 из SEQ ID NO: 18.

7. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где P<sub>B</sub> представляет собой конститутивный промотор.

8. Полинуклеотидная конструкция по п. 7, где указанный P<sub>B</sub> выбран из группы, состоящей из убиквитинового промотора, промотора олеозина, актинового промотора и промотора вируса мозаики Mirabilis (MMV).

9. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где эксцизионная кассета дополнительно содержит кодирующий полинуклеотид C (CP<sub>C</sub>), который кодирует селективируемый маркер, где CP<sub>C</sub> функционально связан с промотором, активным в растительной клетке.

10. Полинуклеотидная конструкция по п. 9, где CP<sub>C</sub> функционально связан с P<sub>B</sub> до вырезания эксцизионной кассеты.

11. Полинуклеотидная конструкция по п. 9, где эксцизионная кассета дополнительно содержит промотор C (P<sub>C</sub>), функционально связанный с CP<sub>C</sub>.

12. Полинуклеотидная конструкция по п. 11, где P<sub>C</sub> представляет собой конститутивный промотор.

13. Полинуклеотидная конструкция по п. 9, где селективируемый маркер выбран из группы, состоящей из флуоресцентного белка, полипептида устойчивости к антибиотикам, полипептида толерантности к гербицидам и метаболического фермента.

14. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где полипептид толерантности к гербицидам, кодируемый CP<sub>B</sub>, представляет собой полипептид глифосат-N-ацетилтрансферазы (GLYAT) или полипептид толерантности к ингибитору ALS.

15. Полинуклеотидная конструкция по п. 14, где указанный полипептид толерантности к ингибитору ALS содержит в ацетолактатсинтазе мутацию, приводящую к высокоустойчивой ALS (HRA).

16. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где эксцизионная кассета дополнительно содержит кодирующий полинуклеотид D (CP<sub>D</sub>), который кодирует фактор пролиферации клеток, функционально связанный с промотором, активным в растительной клетке.

17. Полинуклеотидная конструкция по п. 16, где фактор пролиферации клеток выбран из полипептида WUSCHEL и полипептида babyboom.

18. Полинуклеотидная конструкция по п. 17, где полипептид babyboom содержит по

меньшей мере два домена AP2 и по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

а) аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 67, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 67, одной аминокислотой; и

б) аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 68, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 68, одной аминокислотой.

19. Полинуклеотидная конструкция по п. 17, где CP<sub>D</sub> имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 55, 57, 58, 60, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 87, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 99 или 101;

б) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 55, 57, 58, 60, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 87, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 99 или 101;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 56, 59, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 89, 91, 93, 95, 97, 100 или 102; и

д) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 70% идентичной аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 56, 59, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 89, 91, 93, 95, 97, 100 или 102.

20. Полинуклеотидная конструкция по п. 17, где полинуклеотид, кодирующий полипептид WUSCHEL, имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 103, 105, 107 или 109; и

б) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 103, 105, 107 или 109;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 104, 106, 108 или 110; и

д) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 104, 106, 108 или 110.

21. Полинуклеотидная конструкция по п. 20, где полинуклеотид, кодирующий полипептид WUSCHEL, функционально связан с промотором In2-2 маиса или промотором гена нопаинсинтазы.

22. Полинуклеотидная конструкция по п. 16, где эксцизионная кассета дополнительно содержит промотор D (P<sub>D</sub>), функционально связанный с CP<sub>D</sub>.

23. Полинуклеотидная конструкция по п. 22, где P<sub>D</sub> представляет собой конститутивный промотор.

24. Полинуклеотидная конструкция по п. 23, где P<sub>D</sub> представляет собой убиквитиновый промотор или промотор олеозина.

25. Полинуклеотидная конструкция по п. 16, где эксцизионная кассета содержит по меньшей мере первый кодирующий полинуклеотид D (CP<sub>D1</sub>), который кодирует полипептид babyboom, и второй кодирующий полинуклеотид D (CP<sub>D2</sub>), который кодирует полипептид WUSCHEL.

26. Полинуклеотидная конструкция по п. 1, где полинуклеотидная конструкция дополнительно содержит кодирующий полинуклеотид E (CP<sub>E</sub>), который кодирует

представляющий интерес полипептид, где  $CP_E$  функционально связан с промотором, активным в растительной клетке.

27. Полинуклеотидная конструкция по п. 26, где  $CP_E$  находится за пределами первого и второго сайтов рекомбинации, фланкирующих эксцизионную кассету.

28. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотидную конструкцию по п. 1.

29. Растительная клетка, содержащая полинуклеотидную конструкцию по п. 1 или растение или часть растения, содержащую указанную клетку.

30. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 29, где растение является двудольным.

31. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 29, где растение является однодольным.

32. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 31, где однодольное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, риса, сорго, ячменя, проса, овса, ржи, тритикале, сахарного тростника, проса прутьевидного и дерна/кормовой травы.

33. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 31, где однодольное растение представляет собой пшеницу.

34. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 33, где пшеница представляет собой озимую пшеницу.

35. Растение, часть растения или растительная клетка по п. 34, где озимая пшеница представляет собой *Triticum aestivum* или *Triticum monococcum*.

36. Растение или часть растения по п. 29, где растение или часть растения не поддается трансформации.

37. Часть растения по п. 29, где часть растения представляет собой семя.

38. Способ получения трансгенного растения или части растения, при этом указанный способ предусматривает введение полинуклеотидной конструкции по п. 1 в растение или часть растения.

39. Способ регуляции экспрессии полинуклеотида толерантности к гербицидам, при этом способ предусматривает:

а) получение клетки-хозяина по п. 28; и

б) индукцию экспрессии сайт-специфичной рекомбиназы, благодаря чему вырезается эксцизионная кассета из полинуклеотидной конструкции и экспрессируется полинуклеотид толерантности к гербицидам.

40. Способ отбора толерантной к гербицидам клетки растения, при этом способ предусматривает следующие стадии:

А) получение популяции растительных клеток, где по меньшей мере одна растительная клетка в популяции содержит полинуклеотидную конструкцию по п. 1;

В) индукцию экспрессии сайт-специфичной рекомбиназы; и

С) контакт популяции растительных клеток с гербицидом, к которому полипептид толерантности к гербицидам придает толерантность, благодаря чему происходит отбор растительной клетки, имеющей толерантность к гербициду.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что способ дополнительно предусматривает введение полинуклеотидной конструкции по меньшей мере в одну клетку растения до стадии А).

42. Способ по п. 40, отличающийся тем, что индуцируемый промотор А ( $P_A$ ) индуцируется в ответ на холод, засуху, десикацию, сильную засоленность или их комбинацию.

43. Способ по п. 40, отличающийся тем, что индукция предусматривает десикацию популяции клеток растения.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что десикация происходит во время

созревания незрелого семени.

45. Способ по п. 40, отличающийся тем, что эксцизионная кассета дополнительно содержит кодирующий полинуклеотид С (СР<sub>С</sub>), где СР<sub>С</sub> кодирует селективируемый маркер, функционально связанный с промотором, и где способ дополнительно предусматривает стадию отбора до стадии В), на которой выявляют те клетки растения в популяции клеток растения, которые содержат селективируемый маркер, и где эти отобранные клетки растения представляют собой популяцию клеток растения, которые индуцируют на стадии В).

46. Способ повышения эффективности трансформации растительной ткани, при этом способ предусматривает следующие стадии:

а) получение популяции растительных клеток, где по меньшей мере одна растительная клетка в популяции содержит полинуклеотидную конструкцию по п. 1;

б) культивирование популяции растительных клеток в отсутствие гербицида, в отношении которого полипептид толерантности к гербицидам придает устойчивость к гербициду, в течение периода времени, достаточного для пролиферации популяции растительных клеток;

с) индукцию экспрессии сайт-специфичной рекомбиназы, благодаря чему происходит вырезание эксцизионной кассеты;

д) контакт популяции растительных клеток из с) с гербицидом, к которому полипептид толерантности к гербицидам придает толерантность; и

е) отбор растительной клетки, имеющей толерантность к гербициду, где частота трансформации повышена по сравнению с сопоставимой растительной клеткой, не содержащей эксцизионную кассету и отобранной непосредственно с помощью отбора с использованием гербицида.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что индукция предусматривает десикацию популяции клеток растения.

48. Способ по п. 46, отличающийся тем, что популяцию растительных клеток культивируют в отсутствие гербицида, в отношении которого полипептид толерантности к гербицидам придает устойчивость к гербициду, в течение периода от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 недель до вырезания.

49. Полинуклеотидная конструкция по п. 5, где индуцируемый стрессом промотор представляет собой промотор, активируемый яровизацией.