



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120349** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 10008	(73) Власник(и): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС, 800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, Missouri 63167, United States of America (US)
(22) Дата подання заявки: 13.03.2014	(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.11.2019	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 2530159 A1, 05.12.2012 K. S. Wilson et al, "Transcription Termination at Intrinsic Terminators: The Role of the RNA Hairpin", Proceedings of the National Academy of Sciences, 12.09.1995, vol. 92, no. 19, P. 8793-8797 E. A. Lesnik, "Prediction of rho-independent transcriptional terminators in Escherichia coli", Nucleic Acids Research, 01.09.2001, vol. 29, no. 17, P. 3583-3594 S. Unniraman, "Alternate Paradigm for Intrinsic Transcription Termination in Eubacteria", Journal of Biological Chemistry, 02.11.2001, vol. 276, no. 45, P. 41850 - 41855 QUIAGEN, "The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, The QIAexpress System", 01.06.2003, [онлайн]. Знайдено в < https://www.qiagen.com/ fr/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe- 4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en >, стор. 1- 15, (знайдено 01.10.2018)
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/793,506	
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.03.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2016, Бюл.№ 3	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2019, Бюл.№ 22	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2014/026036, 13.03.2014	
(72) Винахідник(и): Баум Джеймс А. (US), Крістіан Аллен Т. (US), Євдокімов Артьом (US), Моширі Фархад (US), Уївер Ліза Марі (US), Чжан Хайтао (US)	

(54) СКОНСТРУЙОВАНА ЕКСПРЕСІЙНА КОНСТРУКЦІЯ ТА СПОСІБ ПОКРАЩЕННЯ ПРОДУКУВАННЯ РНК І БІЛКА**(57) Реферат:**

Винахід стосується сконструйованої експресійної конструкції, яка містить: (а) промотор; (б) першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує длРНК або білок; та (с) другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому друга послідовність нуклеїнової кислоти містить послідовність термінатора транскрипції *rrn* BT2, послідовність першого термінатора транскрипції P_{ET}, послідовність термінатора транскрипції P_{TH} і послідовність другого термінатора транскрипції P_{ET}; при цьому перша послідовність нуклеїнової кислоти та друга послідовність нуклеїнової кислоти функціонально зв'язані з промотором. Винахід також стосується способу покращення продукування РНК, способу покращення продукування білка,

UA 120349 C2

вектора, який містить сконструйовану експресійну конструкцію, бактеріальної клітини-хазяїна, системи для культивування клітин для синтезу дЛРНК *in vivo*, композиції для контролю зараження безхребетними шкідниками, композиції для пригнічення поширення вірусного захворювання у популяції рослин, способу пригнічення поширення вірусного захворювання у популяції рослин та транскрипційного термінатора.

Передресні посилання на споріднені заявки

У цій заявці заявлений пріоритет згідно з попередньою заявкою № 61/793506, поданою 15 березня 2013 р., яка включена до цього документу у повному обсязі як посилання.

Включення переліку послідовностей

5 Ця заявка містить перелік послідовностей, надісланий з цим документом у електронній формі через мережу EFS, який містить файл під назвою "P34118WO00_59609_2014_03_10_v2ST25.txt", що має розмір 11512 байт (виміряний у Windows XP), створений 10 березня 2014 р., та який включений до цього документу в повному обсязі як посилання.

10 Рівень техніки
Галузь техніки

У заявці представлені векторні конструкції, придатні для експресії РНК *in vitro* та *in vivo*. Представлені також системи для експресії клітин для продукування РНК та білка *in vivo*. Представлені також способи та композиції для введення транскрибованих длРНК в організми-мішені.

15 Опис попереднього рівня техніки

Технічні сільськогосподарські культури часто стають мішенями для атаки вірусів або шкідників, таких як комахи чи нематоди. Зараження шкідниками або вірусною інфекцією може мати суттєвий негативний вплив на врожайність культур. Дуже ефективними для викорінення заражень шкідниками були хімічні пестициди, однак існують недоліки, пов'язані з використанням хімічних пестицидів. Хімічні речовини-пестициди є невибілковими та можуть мати вплив на корисних комах та інші організми, так само як і на цільового шкідника. Хімічні речовини-пестициди стійкі у навколишньому середовищі та, зазвичай, повільно метаболізуються, якщо взагалі метаболізуються. Вони накопичуються у харчовому ланцюзі, а особливо серед видів вищих хижаків, де вони виявляють негативну дію. Накопичення хімічних речовин-пестицидів також призводить до розвитку стійкості до цих речовин. Тому існує необхідність в альтернативних способах контролю або викорінення зараження шкідниками серед рослин або всередині рослин, способи, що є вибілковими, інертними щодо впливу на навколишнє середовище, нестійкими, такими, що біорозкладаються, та такими, які добре підходять для схем управління стійкістю шкідників.

30 Було показано, що дволанцюгові РНК (длРНК) опосередковують інгібування специфічних генів-мішеней у різноманітних організмах через механізм, відомий як РНК-інтерференція (РНКі). РНКі використовує ендogenousні механізми за допомогою дволанцюгової РНК, яка містить комплементарні нуклеотидні послідовності, що практично відповідають смисловій або антисмисловій послідовності-мішені, опосередковує деградацію цільової мРНК або зменшує трансляцію білка з матриці мРНК. Ефекторні білки механізму РНКі включають білковий комплекс Dicer, який утворює малі інтерферуючі РНК (міРНК) з вихідної длРНК, та РНК-індукований комплекс сайленсингу (RISC), який використовує міРНК, керує розпізнаванням і деградацією або блокуванням трансляції відповідних мРНК. Під дію механізму потрапляють лише транскрипти, комплементарні міРНК, і тому нокдаун експресії мРНК звичайно є послідовність-специфічним. Ефект сайленсингу генів РНКі може зберігатися протягом днів та, за експериментальних умов у деяких випадках, може призвести до зниження відносної кількості цільового транскрипта на 90 % або більше з відповідним зниженням рівнів відповідного білка. Рівні білка також можуть порушуватися блокуванням трансляції без суттєвого впливу на рівні мРНК-транскрипта.

45 Хоча молекули длРНК є перспективними як вибілкові, інертні щодо впливу на навколишнє середовище, альтернативними засобами до хімічних речовин-пестицидів для контролю та викорінення зараження шкідниками рослин, проте обмеження щодо кількості длРНК, яка може бути продукована традиційними способами експресії *in vitro* та *in vivo*, та витрати, пов'язані з продукуванням та очищенням наявної длРНК, є перешкодою для її використання для контролю зараження шкідниками і хворобами технічних культур. Відповідно існує потреба в ефективних та рентабельних способах продукування длРНК у кількостях промислового масштабу.

Суть винаходу

55 Декілька варіантів реалізації винаходу, описаних у цьому документі, відносяться до векторних конструкцій, придатних для експресії РНК *in vitro* та *in vivo*. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є дволанцюговою РНК (длРНК). В деяких варіантах реалізації винаходу РНК кодує білок. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є регуляторною РНК. Описані також системи для експресії клітин для ефективного та рентабельного продукування РНК у живих клітинах. Описані також системи для експресії клітин для ефективного та рентабельного продукування білка у живих клітинах. Описані також системи для експресії клітин для

ефективного та рентабельного продукування длРНК у живих клітинах та способи і композиції для введення експресованих длРНК в організми-мішені. Описані композиції та способи можуть використовуватися для продукування молекул РНК для комерційних формуляцій, для ампліфікації послідовностей РНК для аналізу, скринінгу та інших цілей.

5 Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій та способів для ефективного продукування комерційних кількостей молекул РНК культурою клітин. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є дволанцюговою РНК (длРНК). В деяких варіантах реалізації винаходу РНК кодує білок. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є регуляторною РНК. Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої експресійної конструкції, яка містить промотор, РНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, та транскрипційний термінатор, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що включає дві або більше шпильок, причому РНК-кодуюча ділянка і транскрипційний термінатор функціонально зв'язані з промотором. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що включає щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 5-30 пар основ. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 9-18 пар основ. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить стеблову ділянку, що має менше ніж 3 неспарених нуклеотиди. В деяких варіантах реалізації винаходу стеблова ділянка шпильки не містить неспарених нуклеотидів. В деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23.

25 Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій та способів для ефективного продукування комерційних кількостей білка культурою клітин. Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої експресійної конструкції, яка містить промотор, білок-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, та транскрипційний термінатор, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що включає дві або більше шпильок, причому білок-кодуюча ділянка і транскрипційний термінатор функціонально зв'язані з промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що включає щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 5-30 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 9-18 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить стеблову ділянку, що має менше ніж 3 неспарених нуклеотиди. У деяких варіантах реалізації винаходу стеблова ділянка шпильки не містить неспарених нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23.

45 Ці варіанти реалізації винаходу додатково відносяться до композицій та способів ефективного продукування комерційних кількостей молекул длРНК культурою клітин та доставки експресованих молекул длРНК в організми-мішені. Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої длРНК-експресійної конструкції, яка містить промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; першу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки, та другу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до першого термінатора транскрипції, при цьому длРНК-кодуюча ділянка, перший термінатор транскрипції і другий термінатор транскрипції функціонально зв'язані з промотором. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до

другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція додатково містить одну або більше цинк-пальцевих нуклеаз (ZFN), TAL-ефекторну нуклеазу (TALEN) або сайти рестрикції мегануклеаз, розташовані 3'-кінцем до другої послідовності термінатора транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу сайт рестрикції мегануклеаз вибирають з групи, що складається з: I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-LtrI, I-GpiI, I-GZeI, I-OnuI, I-HjeMI, I-MsoI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція додатково містить 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше додаткових послідовностей термінатора транскрипції, розташованих 3'-кінцем до длРНК-кодуючої послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить дві або більше Rho-незалежних послідовностей термінатора транскрипції, кожна з яких незалежно вибрана з групи, що складається з: РТН-термінатора, термінатора рЕТ-Т7, термінатора Т3-Тф, термінатора рВR322-Р4, термінатора вірусу везикулярного стоматиту, термінатора *rrnB-TI*, термінатора *rrnC* та транскрипційного термінатора *TTadс*, таким чином, що послідовності промотора і термінатора транскрипції утворюють функціональну комбінацію. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність транскрипційного термінатора є послідовністю транскрипційного термінатора дріжджів. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить один або більше Rho-незалежних сигналів термінації транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше три шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є РТН, а другий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є *rrn BT2*, другий термінатор транскрипції є РЕТ, третій термінатор транскрипції є РТН та четвертий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції є термінаторами *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції утворюють вторинну структуру, яка містить 4 шпильки середнього розміру.

Декілька варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої експресійної конструкції, яка містить промотор, РНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у напрямку на пряму зчитування промотора, та сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, розташований 3'-кінцем до РНК-кодуючої ділянки. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є дволанцюговою РНК (длРНК). В деяких варіантах реалізації винаходу РНК кодує білок. У деяких варіантах реалізації винаходу РНК є регуляторною РНК. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК-кодуюча ділянка кодує длРНК та містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, вибраний з групи, що складається з: сайту рестрикції цинк-пальнової нуклеази (ZFN), сайту рестрикції TAL-ефекторної нуклеази (TALEN) та сайту рестрикції мегануклеаз. У деяких варіантах реалізації винаходу сайт рестрикції мегануклеаз вибирають з групи, що складається з: I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-LtrI, I-GpiI, I-GZeI, I-OnuI, I-HjeMI, I-MsoI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить одну або більше послідовностей термінаторів транскрипції, транскрипційно розташованих у прямому напрямку зчитування РНК-кодуючої ділянки та 5'-кінцем до сайту рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить длРНК-кодуючу ділянку, яка переважно

включає SEQ ID NO 2. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить промотор бактеріофага.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до вектора, що містить сконструйовану експресійну конструкцію, яка включає промотор, РНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, та сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, розташований 3'-кінцем до РНК-кодуючої ділянки. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК є дволанцюговою РНК (длРНК). В деяких варіантах реалізації винаходу РНК кодує білок. У деяких варіантах реалізації винаходу РНК є регуляторною РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу РНК-кодуюча ділянка кодує длРНК та містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, вибраний з групи, що складається з: сайту рестрикції цинк-пальцевої нуклеази (ZFN), сайту рестрикції TAL-ефекторної нуклеази (TALEN) та сайту рестрикції мегануклеаз. У деяких варіантах реалізації винаходу сайт рестрикції мегануклеаз вибирають з групи, що складається з: I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I PpoI, I-ScellI, I-Crel, I-Ltrl, I-Gpil, I-GZel, I-Onul, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить один або більше послідовностей термінаторів транскрипції, транскрипційно розташованих у прямому напрямку зчитування РНК-кодуючої ділянки та 5'-кінцем до сайту рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована експресійна конструкція містить длРНК-кодуючу ділянку, яка переважно включає SEQ ID NO 2. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор бактеріофага. В деяких варіантах реалізації вектор є плазмідним вектором.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої експресійної конструкції, яка містить: промотор, першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує длРНК, регуляторну РНК або білок; та другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, яка включає дві або більше шпильок, при цьому перша послідовність нуклеїнової кислоти та друга послідовність нуклеїнової кислоти функціонально зв'язані з промотором. У деяких варіантах реалізації друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок щонайменше 5 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зі шпильок містить 5-30 пар основ.

У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 9-18 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу друга послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор є промотором бактеріофага. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор вибирають з групи, що складається з: T7, T3, SV40, SP6, T5, промотора β-лактамази, промотора галактози E. coli, промотора арабінози, промотора лужної фосфатази, промотора триптофану (trp), промотора лактозного оперону (lac), промотора lacUV5, промотора trc та промотора tac. У деяких варіантах реалізації винаходу перша послідовність нуклеїнової кислоти містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта. В деяких варіантах реалізації винаходу перша послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 та 20.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до вектора, що містить сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, яка включає промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; першу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки, та другу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до першого термінатора транскрипції, при цьому длРНК-кодуюча ділянка, перший термінатор транскрипції і другий термінатор транскрипції функціонально зв'язані з промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція додатково містить одну або більше цинк-пальцевих нуклеаз (ZFN), TAL-ефекторну нуклеазу (TALEN) або сайти рестрикції мегануклеаз, розташовані 3'-кінцем до другої послідовності термінатора транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу сайт рестрикції мегануклеаз вибирають з групи, що складається з: I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-SceII, I PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-LtrI, I-GpiI, I-GZel, I-OnuI, I-HjeMI, I-MsoI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція додатково містить 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше додаткових послідовностей термінатора транскрипції, розташованих 3'-кінцем до длРНК-кодуючої послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить дві або більше Rho-незалежних послідовностей термінатора транскрипції, кожна з яких незалежно вибрана з групи, що складається з: РТН-термінатора, термінатора рЕТ-Т7, термінатора Т3-Тф, термінатора рBR322-Р4, термінатора вірусу везикулярного стоматиту, термінатора *rrnB-TI*, термінатора *rrnC* та транскрипційного термінатора ТТadс, таким чином, що послідовності промотора і термінатора транскрипції утворюють функціональну комбінацію. В деяких варіантах реалізації вектор є плазмідним вектором. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше три шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є РТН, а другий термінатор транскрипції є РЕТ. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є *rrn BT2*, другий термінатор транскрипції є РЕТ, третій термінатор транскрипції є РТН та четвертий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції є термінаторами *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції утворюють вторинну структуру, яка містить 4 шпильки середнього розміру.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до бактеріальної клітини-хазяїна, яка містить вектор, що включає сконструйовану експресійну конструкцію, яка містить: промотор, першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує длРНК, регуляторну РНК або білок; та другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, яка включає дві або більше шпильок, при цьому перша послідовність нуклеїнової кислоти та друга послідовність нуклеїнової кислоти функціонально зв'язані з промотором. У деяких варіантах реалізації друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок щонайменше 5 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 5-30 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації

винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. В деяких варіантах реалізації винаходу друга послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор є промотором бактеріофага. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор вибирають з групи, що складається з: T7, T3, SV40, SP6, T5, промотора β -лактамази, промотора галактози *E. coli*, промотора арабінози, промотора лужної фосфатази, промотора триптофану (*trp*), промотора лактозного оперону (*lac*), промотора *lacUV5*, промотора *trc* та промотора *tac*. В деяких варіантах реалізації винаходу перша послідовність нуклеїнової кислоти містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта. В деяких варіантах реалізації винаходу перша послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 та 20. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн не експресує РНКазу А. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є клітиною *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є мертвою та нелізованою. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн може використовуватися в композиції для контролю зараження безхребетними шкідниками або для пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу контролю за зараженням безхребетними шкідниками, який включає нанесення на рослину мертвих та нелізованих бактерій. В деяких варіантах реалізації винаходу мертві та нелізовані бактерії за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, описаних вище, наносять на рослинне джерело харчування як вірусний вектор комах або нематод у спосіб, що забезпечує пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до бактеріальної клітина-хазяїна, яка містить вектор, що включає сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, яка містить промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; та сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, розташований 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до бактеріальної клітина-хазяїна, яка містить вектор, що включає сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, яка містить промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; першу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки, та другу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до першого термінатора транскрипції, при цьому длРНК-кодуюча ділянка, перший термінатор транскрипції і другий термінатор транскрипції функціонально зв'язані з промотором. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 5'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу перша смисло-орієнтована нуклеотидна послідовність розташована 3'-кінцем до другої антисмисло-орієнтованої нуклеотидної послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше три шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є РТН, а другий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована

длРНК-експресійна конструкція містить перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є *rrn BT2*, другий термінатор транскрипції є *PET*, третій термінатор транскрипції є *PTH* та четвертий термінатор транскрипції є *PET*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції є термінаторами *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції утворюють вторинну структуру, яка містить 4 шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн не експресує РНКазу *A*. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є клітиною *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є мертвою та нелізованою. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн може використовуватися в композиції для контролю зараження безхребетними шкідниками або для пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу контролю за зараженням безхребетними шкідниками, який включає нанесення на рослину мертвих та нелізованих бактерій. У деяких варіантах реалізації винаходу мертві та нелізовані бактерії за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, описаних вище, наносять на рослинне джерело харчування як вірусний вектор комах або нематод у спосіб, що забезпечує пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до системи для культивування клітин для синтезу РНК *in vivo*, яка включає бактеріальну клітину-хазяїна та середовище для вирощування, причому бактеріальна клітина-хазяїн містить вектор, що включає сконструйовану експресійну конструкцію, яка містить: промотор, першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує длРНК, регуляторну РНК або білок; та другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, при цьому друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. В деяких варіантах реалізації друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу друга послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23. В деяких варіантах реалізації винаходу середовище для вирощування містить 3,2 % триптон, 2 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 1 % гліцерину, 0,1 % глюкози, 0,4 % альфа-лактози, 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ KH_2PO_4 , 40 мМ Na_2HPO_4 , 2 мМ MgSO_4 .

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до системи для культивування клітин для синтезу білка *in vivo*, яка включає бактеріальну клітину-хазяїна та середовище для вирощування, причому бактеріальна клітина-хазяїн містить вектор, що включає сконструйовану експресійну конструкцію, яка містить промотор, першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує цільовий білок; та другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, при цьому друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу друга послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23. В деяких варіантах реалізації винаходу середовище для вирощування містить 3,2 % триптон, 2 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 1 % гліцерину, 0,1 % глюкози, 0,4 % альфа-лактози, 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ KH_2PO_4 , 40 мМ Na_2HPO_4 , 2 мМ MgSO_4 .

У деяких варіантах реалізації винаходу представлена система для культивування клітин для синтезу длРНК *in vivo*, що включає бактеріальну клітину-хазяїна, яка містить вектор, що включає сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, яка містить промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; та сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, розташований 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки, та представлене середовище для вирощування. В деяких варіантах реалізації винаходу система для культивування клітин для синтезу длРНК *in vivo*, що включає бактеріальну клітину-хазяїна, яка

містить вектор, що включає сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, яка містить промотор; длРНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому длРНК-кодуюча ділянка містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта; першу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки, та другу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до першого термінатора транскрипції, при цьому длРНК-кодуюча ділянка, перший термінатор транскрипції і другий термінатор транскрипції функціонально зв'язані з промотором, та представлене середовище для вирощування. В деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. В деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше три шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є РТН, а другий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є *grn* BT2, другий термінатор транскрипції є РЕТ, третій термінатор транскрипції є РТН та четвертий термінатор транскрипції є РЕТ. У деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції є термінаторами *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції утворюють вторинну структуру, яка містить 4 шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу середовище для вирощування містить 3,2 % триптон, 2 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 1 % гліцерину, 0,1 % глюкози, 0,4 % альфа-лактози, 50 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ KH₂PO₄, 40 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ MgSO₄.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до лізату бактеріальної клітини-хазяїна, що містить вектор, який включає сконструйовану експресійну конструкцію, що містить промотор, РНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому РНК-кодуюча ділянка кодує длРНК, регуляторну РНК або білок; та сайт рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, розташований 3'-кінцем до РНК-кодуючої ділянки, для контролю зараженням безхребетними шкідниками або для пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до лізату бактеріальної клітини-хазяїна, що містить вектор, який включає сконструйовану РНК-експресійну конструкцію, що містить промотор, РНК-кодуючу ділянку, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому РНК-кодуюча ділянка кодує длРНК, регуляторну РНК або білок; першу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до длРНК-кодуючої ділянки; і другу послідовність термінатора транскрипції, розташовану 3'-кінцем до першого термінатора транскрипції, причому РНК-кодуюча ділянка, перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції функціонально зв'язані з промотором для контролю зараження безхребетними шкідниками або для пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує перший термінатор транскрипції та другий термінатор транскрипції, утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше три шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є РТН, а другий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована длРНК-експресійна конструкція містить перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції є *grn* BT2, другий термінатор транскрипції є РЕТ, третій термінатор транскрипції є РТН та четвертий термінатор транскрипції є РЕТ. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор транскрипції та четвертий термінатор транскрипції є термінаторами *E. coli*. В деяких варіантах реалізації винаходу перший термінатор транскрипції, другий термінатор транскрипції, третій термінатор

транскрипції та четвертий термінатор транскрипції утворюють вторинну структуру, яка містить 4 шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу РНК-кодуюча ділянка кодує длРНК та містить першу смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично відповідає послідовності-мішені, другу антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та третю нуклеотидну послідовність, яка фланкована першою та другою нуклеотидними послідовностями та яка кодує один або більше нуклеотидів петлевої ділянки РНК-транскрипта. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу контролю за зараженням безхребетними шкідниками, який включає нанесення на рослину бактеріального лізату. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальний лізат за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, описаних вище, наносять на рослинне джерело харчування як вірусний вектор комах або нематод у спосіб, що забезпечує пригнічення поширення вірусної хвороби у популяції рослин.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до транскрипційного термінатора, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що включає дві або більше шпильок. У деяких варіантах реалізації ця послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 5-30 пар основ. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить 9-18 пар основ. В деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить стеблову ділянку з менше ніж 3 неспареними нуклеотидами. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна з шпильок містить стеблову ділянку без неспарених нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу ця послідовність нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 18 та 21-23.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу модулювання продукування РНК на експресійному векторі, що включає введення в експресійний вектор транскрипційного термінатора функціонально зв'язаного з промотором та РНК-кодуючою ділянкою, причому транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, яка містить вибрану кількість шпильок середнього розміру, при цьому продукування РНК збільшується шляхом введення транскрипційного термінатора, що утворює вторинну структуру, яка містить збільшену кількість шпильок середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить одну шпильку середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить дві шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить три шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить чотири шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить п'ять шпильок середнього розміру.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу модулювання продукування білка на експресійному векторі, що включає введення експресійного вектора транскрипційного термінатора функціонально зв'язаного з промотором та білок-кодуючою ділянкою, причому транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, яка містить вибрану кількість шпильок середнього розміру, при цьому продукція білка збільшується шляхом введення транскрипційного термінатора, що утворює вторинну структуру, яка містить збільшену кількість шпильок середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить одну шпильку середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить дві шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить три шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить чотири шпильки середнього розміру. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрипційний термінатор утворює вторинну структуру, що містить п'ять шпильок середнього розміру.

Короткий опис графічних матеріалів

На фігурі 1А проілюстровано схематичне представлення сконструйованої длРНК-експресійної конструкції, яка містить у напрямку від 5' до 3' промотор, функціонально зв'язаний з фрагментом смислової ДНК, кодуючу петлю ділянку, фрагмент антисмислової ДНК, перший транскрипційний термінатор та другий транскрипційний термінатор.

На фігурі 1В проілюстровано схематичне представлення сконструйованої длРНК-експресійної конструкції, яка містить у напрямку від 5' до 3' промотор, функціонально зв'язаний з фрагментом антисмислової ДНК, кодуючу петлю ділянку, фрагмент смислової ДНК, перший транскрипційний термінатор та другий транскрипційний термінатор.

5 На фігурі 2А проілюстровано схематичне представлення вектора рСРВ-*hr*.

На фігурі 2В проілюстровано схематичне представлення вектора рСРВ-*hr*+2Т.

На фігурі 2С проілюстровано часткову карту вектора рСРВ-*hr*+2Т.

10 Фігура 3А є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну РНК, виділену з 20 мкл культури, вирощеної протягом ночі при 37°C (ліві доріжки) або 25°C (праві доріжки). Доріжки, позначені "1", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рUC19/HT115(DE3). Доріжки, позначені "2", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*/HT115(DE3). Доріжки, позначені "3", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*+2Т/HT115(DE3). Доріжки, позначені "4", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рUC19/HT115(DE3)+pLac-T7. Доріжки, позначені "5", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*/HT115(DE3)+pLac-T7. Доріжки, позначені "6", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*+2Т/HT115(DE3)+pLac-T7.

20 Фігура 3В є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє оброблену РНКазою А загальну РНК, виділену з 20 мкл культури, вирощеної протягом ночі при 37°C (ліві доріжки) або 25°C (праві доріжки). Доріжки, позначені "1", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рUC19/HT115(DE3). Доріжки, позначені "2", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*/HT115(DE3). Доріжки, позначені "3", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*+2Т/HT115(DE3). Доріжки, позначені "4", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рUC19/HT115(DE3)+pLac-T7. Доріжки, позначені "5", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*/HT115(DE3)+pLac-T7. Доріжки, позначені "6", ілюструють загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*+2Т/HT115(DE3)+pLac-T7.

25 Фігура 4 є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну бактеріальну РНК без індукції на доріжці 1 та загальну бактеріальну РНК з індукцією на доріжці 2. М: маркер.

30 Фігура 5А є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє транскрибовану в бактеріях РНК (доріжки 5-8) та транскрибовану *in vitro* РНК (доріжки 9 та 10) без розщеплення РНКазою А. На доріжці 4 проілюстровано маркер визначення розмірів. На доріжці 5 проілюстровано 10-кратне розведення SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 6 проілюстровано 50-кратне розведення SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 7 проілюстровано 10-кратне розведення профільтрованої за допомогою центрифуги за розміром 30 К SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 8 проілюстровано 50-кратне розведення профільтрованої за допомогою центрифуги за розміром 30 К SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 9 проілюстровано 100-кратне розведення РНК, транскрибованої *in vitro* на лінеаризованому векторі рСРВ-*hr*+2Т. На доріжці 10 проілюстровано 500-кратне розведення РНК, транскрибованої *in vitro* на лінеаризованому векторі рСРВ-*hr*+2Т.

40 Фігура 5В є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє результати розщеплення РНКазою А транскрибованої в бактеріях РНК (доріжки 5-8) та транскрибованої *in vitro* РНК (доріжки 9 та 10). На доріжці 4 проілюстровано маркер визначення розмірів. На доріжці 5 проілюстровано 10-кратне розведення SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 6 проілюстровано 50-кратне розведення SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 7 проілюстровано 10-кратне розведення профільтрованої за допомогою центрифуги за розміром 30 К SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 8 проілюстровано 50-кратне розведення профільтрованої за допомогою центрифуги за розміром 30 К SNAP-модифікованої очищеної РНК. На доріжці 9 проілюстровано 100-кратне розведення РНК, транскрибованої *in vitro* на лінеаризованому векторі рСРВ-*hr*+2Т. На доріжці 10 проілюстровано 500-кратне розведення РНК, транскрибованої *in vitro* на лінеаризованому векторі рСРВ-*hr*+2Т.

50 На фігурі 6 проілюстровано мікрофотографії клітин *E. coli* після інкубації при 37, 51, 62 або 72°C протягом 30 хвилин.

55 Фігура 7А є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну РНК, виділену з бактерій рDV49, вирощених на середовищі для аутоіндукції (AIM) (доріжка 5), середовищі Super Broth+AIM (доріжка 6), або середовищі Plasmid+AIM (доріжка 7). На доріжці 4 проілюстровано маркер визначення розмірів. Полоси, що відповідають длРНК DV49, вказані стрілкою.

Фігура 7В є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну РНК, виділену з бактерій рСРВ-*hr*+2Т, вирощених на середовищі Super Broth+AIM (доріжка 5). На доріжці 4 проілюстровано маркер визначення розмірів. Полоса, що відповідає длРНК СРВ, вказана стрілкою.

60 На фігурі 8 проілюстровано схематичне представлення вектора рDV49+2Т.

На фігурі 9 проілюстровано схематичне представлення плазмідного вектора, який містить фрагмент смислової ДНК, та фрагмент комплементарної антисмислової ДНК, вставлені між 3'-кінцем промотора та сайтом розпізнавання нуклеази. Експресія нуклеази лінеаризує цей вектор.

5 Фігура 10 є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну РНК, виділену з бактерій *E. coli*, які містять РНК-експресійні вектори з різними термінаторами або комбінаціями термінаторів. Маркер визначення розмірів проілюстровано на доріжці "М". На доріжці 1 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-PET/HT115(DE3). На доріжці 2 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-PTH1/HT115(DE3). На доріжці 3 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-PTH2/HT115(DE3). На доріжці 4 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-BT1/HT115(DE3). На доріжці 5 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-BT2/HT115(DE3). На доріжці 6 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-CJ/HT115(DE3). На доріжці 7 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-B1002/HT115(DE3). На доріжці 8 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-B1006/HT115(DE3). На доріжці 9 проілюстровано РНК, виділену з бактерій з термінатором pUC19-PTH+PET/HT115(DE3).

20 На фігурі 11 проілюстровано вторинні структури, утворені термінаторами PTH+PET (SEQ ID NO. 13); CJ (SEQ ID NO. 10); rrn BT2 (SEQ ID NO. 9); rrnBT1 (SEQ ID NO. 8); PTH (SEQ ID NO. 7); PET (SEQ ID NO. 13); B1006 (SEQ ID NO. 12) та B1002 (SEQ ID NO. 11), як визначено з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). Проілюстрована вільна енергія вторинних структур може бути знайдена в табл. 5.

25 На фігурі 12 проілюстровано вторинні структури, утворені РНК-шпильками різних розмірів та термінаторами PTH+PET, як визначено з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). На фігурі 12А проілюстровано вторинну структуру, утворену 27-мерною РНК-шпилькою та термінатором PTH+PET. На фігурі 12В проілюстровано вторинну структуру, утворену 240-мерною РНК-шпилькою та термінатором PTH+PET. На фігурі 12С проілюстровано вторинну структуру, утворену 280-мерною РНК-шпилькою та термінатором PTH+PET. Структура, утворена термінатором PTH+PET, є кільцевою.

30 Фігура 13 є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє вихід РНК, отриманий для кожної з експресійних конструкцій 27-мерної РНК-шпильки/термінатора PTH+PET, 240-мерної РНК-шпильки/термінатора PTH+PET та 280-мерної РНК-шпильки/термінатора PTH+PET.

35 Фігура 14 є фотографією агарозного гелю, яка ілюструє загальну РНК, виділену з бактерій *E. coli*, які містять РНК-експресійні вектори з різними кількостями та комбінаціями термінаторів. На доріжці 1 проілюстровано загальну РНК, виділену з бактерій з 2 термінаторами pUC19-PTH+PET/HT115(DE3). На доріжці 2 проілюстровано загальну РНК, виділену з бактерій з 4 термінаторами pUC19-rrn BT2+PTH+PET/HT115(DE3). На доріжці 3 проілюстровано загальну РНК, виділену з бактерій з 4 термінаторами pUC19-PET+rrn BT2+PTH+PET/HT115(DE3). На доріжці 4 проілюстровано загальну РНК, виділену з бактерій з 3 термінаторами pUC19-rrn BT2+PTH+PET/HT115(DE3).

40 На фігурі 15 проілюстровано вторинні структури, утворені різними кількостями та комбінаціями термінаторів, як визначено з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). На фігурі 15А проілюстровано вторинну структуру, утворену 2 термінаторами, PTH+PET. На фігурі 15В проілюстровано вторинну структуру, утворену 4 термінаторами, rrn BT2+PET+PTH+PET. На фігурі 15С проілюстровано вторинну структуру, утворену 4 термінаторами, PET+rrn BT2+PTH+PET. На фігурі 15D проілюстровано вторинну структуру, утворену 3 термінаторами, rrn BT2+PTH+PET. Шпилькові структури середнього розміру, утворені комбінаціями термінаторів, є кільцевими.

50 Фігура 16 є фотографією гелю ДСН-ПААГ, яка ілюструє загальний білок, виділений з клітин BL21(DE3), які містять експресійні вектори з різними кількостями та комбінаціями термінаторів. Експресований білок, білок А, має молекулярну масу 21k. Маркер визначення розмірів проілюстровано на доріжці "М". На доріжці "А" міститься білок, виділений з клітин, що містять термінаторну експресійну конструкцію pUC+PET. На доріжці "В" міститься білок, виділений з клітин, що містять термінаторну експресійну конструкцію pUC+rrn BT2. На доріжці "С" міститься білок, виділений з клітин, що містять термінаторну експресійну конструкцію pUC+PTH+PET. На доріжці "D" міститься білок, виділений з клітин, що містять термінаторну експресійну конструкцію pUC+rrn BT2+PET+PTH+PET.

60 На фігурі 17 проілюстровано вторинні структури, утворені сконструйованими термінаторами, як визначено з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). На фігурі 17А проілюстровано вторинну структуру, утворену 4 термінаторами, rrn BT2+PET+PTH+PET (SEQ ID

№ 18). На фігурі 17B проілюстровано вторинну структуру, утворену SEQ ID 21. На фігурі 17C проілюстровано вторинну структуру, утворену SEQ ID 22. На фігурі 17D проілюстровано вторинну структуру, утворену SEQ ID 23.

Детальний опис винаходу

Наступний детальний опис винаходу приведений для допомоги спеціалістам у цій галузі техніки у практичній реалізації цього винаходу. Спеціалісти в цій галузі техніки можуть робити модифікації та варіації варіантів реалізації винаходу, описані у цьому документі, без відходження від суті або обсягу цього винаходу.

А. Визначення термінів

Якщо не визначено інше, всі технічні та наукові терміни, використані у цьому документі, мають таке саме значення, як звичайно розуміється середнім спеціалістом у цій галузі техніки. Коли термін представлений в однині, то якщо не вказано інше, також розглядається множина цього терміну. Якщо не стверджується інше, послідовності нуклеїнових кислот в тексті цього опису подано у напрямку від 5' до 3' відносно промотора.

У наступному описі багато термінів використовується в широкому розумінні. Наступні визначення представлені для полегшення розуміння цих варіантів реалізації винаходу.

Як використовується у цьому документі, слово в однині може означати один або більше одного.

Як використовується у цьому документі, слово "близько" вказує, що значення включає внутрішню варіацію похибки способу, який був використаний для визначення значення, або варіацію, яка існує між експериментами.

Буде зрозуміло, що хоча терміни "перший", "другий" і т.д. можуть використовуватися в цьому документі для опису різних елементів, ці елементи не повинні обмежуватися цими термінами. Ці терміни використовують лише для розрізнення одного елемента від іншого.

Як використовується у цьому документі, термін "нуклеїнова кислота" або "молекула нуклеїнової кислоти" відноситься до одно- або дволанцюгового полімеру з дезоксирибонуклеотидних або рибонуклеотидних основ. Молекули нуклеїнових кислот можуть складатися з мономерів, які є нуклеотидами, що зустрічаються у природі (такі як ДНК та РНК), або аналоги нуклеотидів, що зустрічаються у природі (наприклад, енантіомерні форми нуклеотидів, що зустрічаються у природі), або комбінацій обох варіантів. Модифіковані нуклеотиди можуть мати зміни у цукрових фрагментах та/або фрагментах піримідинових або пуринових основ. Модифікації цукрів включають, наприклад, заміщення однієї або більше гідроксильних груп галогенами, алкільними групами, амінами або азидогрупами, або цукри можуть бути функціоналізовані як етери або естери. Більше того, цілий фрагмент цукру може бути заміщений стерично або електронно подібними структурами, такими як аза-цукри або карбоциклічні аналоги цукрів. Приклади модифікацій у фрагментах основ включають пурини та піримідини, ацильовані пурини або піримідини, або інші добре відомі гетероциклічні замінники. Мономери нуклеїнових кислот можуть бути зв'язані фосфодіестерними зв'язками або аналогами таких зв'язків. Аналоги фосфодіестерних зв'язків включають фосфоротіоат, фосфородитіоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанілотіоат, фосфоранілідат, фосфорамідат та тому подібні.

"Виділена молекула нуклеїнової кислоти" є молекулою нуклеїнової кислоти, яка не інтегрована до геномної ДНК організму. Наприклад, молекула ДНК, яка кодує рецептор, яка була відділена від геномної ДНК клітини, є виділеною молекулою ДНК. Інший необмежувачий приклад виділеної молекули нуклеїнової кислоти є хімічно синтезованою молекулою нуклеїнової кислоти, яка не інтегрована до геному організму. Інший необмежувачий приклад виділеної молекули нуклеїнової кислоти є молекулою нуклеїнової кислоти, яка виділена з конкретних видів, яка менша за цілу молекулу ДНК хромосоми цих видів.

Термін "вектор" відноситься до молекули ДНК, яка використовується як носій для штучного перенесення чужорідного генетичного матеріалу до клітини-хазяїна, де він може реплікуватися та/або експресуватися. Послідовність ДНК вектора зазвичай включає послідовність-вставку (трансген) та більшу послідовність, що слугує "скелетом". Скелет вектора може містити один або більше сайтів розпізнавання ендонуклеаз рестрикції, що дозволяють виконати вставку молекули нуклеїнової кислоти у спосіб, що може забезпечити визначення, без втрати основної біологічної функції вектора, нуклеотидні послідовності, які кодують маркерний ген, що придатний для використання для ідентифікації та відбору клітин, трансдукованих вектором, та точку початку реплікації. Експресійні вектори (експресійні конструкції) звичайно мають промоторну послідовність, що керує експресією трансгена у клітині-хазяїні. Приклади векторів, придатних для використання у відповідності з цими варіантами реалізації винаходу, включають, але без обмеження, плазміди, косміди, пластоми, штучні хромосоми та бактеріофаг.

Терміни "промотор" та "промоторна послідовність" можуть використовуватися взаємозамінно та відносяться до послідовності ДНК, яка при лігуванні з цільовою послідовністю, здатна контролювати транскрипцію цільової нуклеотидної послідовності в РНК. Терміни "промотор" та "промоторна послідовність" включають мінімальний промотор, який є короткою послідовністю ДНК, що включає ТАТА-бокс та інші послідовності ДНК, що слугують для визначення сайту ініціації транскрипції або задіяні у побудові білкових факторів, які контролюють ефективність ініціації транскрипції у відповідь на фізіологічні умови. Промотори можуть бути гомологічними, цілком отриманими з нативного гена клітини-хазяїна, або гетерологічними, отриманими повністю або частково з іншого організму, або складатися з різних елементів, отриманих з різних промоторів, знайдених у природі, або складатися із сегментів синтетичної ДНК. Як використовується у цьому документі, промотор може бути конститутивно активним промотором або регульованим промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути репресибельним. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути індукцибельним.

Коли експресія нуклеотидної послідовності поміщається під контроль промотора, то така нуклеотидна послідовність називається "функціонально зв'язаною з" промотором. Подібним чином, регуляторний елемент та коровий промотор є "функціонально зв'язані", якщо регуляторний елемент модулює активність корового промотора.

Термін "клітина-хазяїн" відноситься до будь-якої клітини, здатної реплікувати та/або транскрибувати вектор, розроблений у відповідності з цими варіантами реалізації винаходу. Клітини-хазяї для використання у цих варіантах реалізації винаходу можуть бути прокаріотичними клітинами, такими як *E. coli*, або еукаріотичними клітинами, такими як клітини грибів, рослин, комах, амфібій, птахів або ссавців. Вставку вектора у клітину-мішень, як правило, називають трансформацією для бактеріальних клітин, трансфекцією для еукаріотичних клітин, хоча вставку вірусного вектора часто називають трансдукцією.

Термін "експресія" або "експресія гена" відноситься до біосинтезу продукту гена. Наприклад, у випадку функціональної РНК, експресія гена залучає транскрипцію гена у РНК.

Як використовується у цьому документі, фраза "інгібування експресії гена" або "інгібування експресії гена-мішені" або "супресія гена" або "супресія гена-мішені" відноситься до відсутності (або зниження, яке спостерігається) рівня білкового продукту та/або продукту мРНК гена-мішені.

Як використовується у цьому документі, термін "РНК-транскрипт" відноситься до продукту, отриманого в результаті транскрипції, каталізованої РНК-полімеразою, послідовності ДНК. Коли РНК-транскрипт є точною комплементарною копією послідовності ДНК, то він розглядається як первинний транскрипт, або він може бути послідовністю РНК, отриманою у посттранскрипційному процесуванні первинного транскрипта, та розглядатися як зріла РНК.

Як використовується у цьому документі, термін "сміслова РНК" відноситься до РНК-транскрипта, що відповідає послідовності або сегменту, який при продукуванні організмом-мішенню знаходиться у формі мРНК, що здатна транслюватися організмом-мішенню у білок. У деяких варіантах реалізації винаходу організмом-мішенню є шкідник.

Як використовується у цьому документі термін "антисміслова РНК" відноситься до РНК-транскрипта, який комплементарний всій або частині мРНК, що нормально продукується у клітині або організмі-мішені. Комплементарність антисмісловій РНК може узгоджуватися з будь-якою частиною специфічного транскрипта гена, тобто на 5'-кінці некодуючої послідовності, 3'-кінці нетрансльованої послідовності, інтронах або кодуючій послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу організмом-мішенню є шкідник.

Термін "еталонна послідовність" відноситься до послідовності, використаної як основа для порівняння послідовностей, еталонна послідовність може бути підмножиною більшої послідовності, наприклад, у вигляді сегменту повнорозмірної послідовності кДНК, наданої у переліку послідовностей або може включати послідовність повного гена. Звичайно, еталонна послідовність має щонайменше 20 нуклеотидів у довжину, нерідко щонайменше 25 нуклеотидів у довжину і часто щонайменше 50 нуклеотидів у довжину.

Як використовується у цьому документі термін "послідовність-мішень" відноситься до нуклеотидної послідовності гена, націленого на супресію, що відповідає дуплекс-утворюючій ділянці длРНК. У цьому контексті термін "ген" означає здатну до локалізації ділянку геномної послідовності, що відповідає одиниці спадковості, яка включає регуляторні ділянки, транскрибовані ділянки та/або інші функціональні ділянки послідовностей. Залежно від обставин, термін послідовність-мішень може відноситися до повнорозмірної нуклеотидної послідовності гена, націленого на супресію, або нуклеотидної послідовності частини гена, націленого на супресію.

Першу нуклеотидну послідовність, при знаходженні її у напрямку від 5' до 3', називають "комплементарною" або "комплементарною до" другої еталонної нуклеотидної послідовності, знайденої у напрямку від 3' до 5', якщо послідовність першої нуклеотидної послідовності є зворотно комплементарною еталонній нуклеотидній послідовності. Для ілюстрації, нуклеотидна послідовність "CATTAG" відповідає еталонній послідовності "CATTAG" та комплементарна еталонній послідовності "GTAATC". Молекули послідовностей нуклеїнових кислот називають такими, що проявляють "повну комплементарність", коли кожен нуклеотид однієї послідовності, зчитуваний у напрямку від 5' до 3', є комплементарним кожному нуклеотиду іншої послідовності при зчитуванні у напрямку від 3' до 5'.

Як використовується у цьому документі, "петля" відноситься до структури, сформованої одним ланцюгом нуклеїнової кислоти, в якій комплементарні ділянки, які фланкують конкретну одноланцюгову нуклеотидну ділянку, гібридизуються таким чином, що одноланцюгова нуклеотидна ділянка між комплементарними ділянками виключається з утворення дуплекса або спарювання основ за Уотсоном-Кріком. Петля є одноланцюговою нуклеотидною ділянкою будь-якої довжини.

Як використовується у цьому документі, термін "ідентичність послідовностей", "подібність послідовностей" або "гомологія" використовується для опису взаємозв'язків між двома або більше нуклеотидними послідовностями. Відсоток "ідентичності послідовностей" між двома послідовностями визначають шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у вікні порівняння таким чином, що частина послідовності у вікні порівняння може включати добавлення або делеції (тобто гепи) при порівнянні з еталонною послідовністю (яка не включає добавлення або делеції) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Відсоток розраховується шляхом визначення кількості положень, в яких ідентична основа нуклеїнової кислоти або амінокислотний залишок зустрічається в обох послідовностях, що дає кількість положень, що співпали, поділом кількості положень, що співпали, на загальну кількість положень у вікні порівняння, та множенням результату на 100 для отримання відсотку ідентичності послідовностей. Послідовність, яка є ідентичною у кожному положенні при порівнянні з еталонною послідовністю, називається ідентичною еталонній послідовності та навпаки.

Як використовується у цьому документі, "вікно порівняння" відноситься до концептуального сегмента зі щонайменше 6 суміжних положень, звичайно від близько 50 до близько 100, частіше від близько 100 до близько 150, в яких послідовність порівнюється з еталонною послідовністю з такою ж кількістю суміжних положень після оптимального вирівнювання двох послідовностей. Для оптимального вирівнювання двох послідовностей вікно порівняння може включати добавлення або делеції (тобто гепи) на рівні близько 20 % або менше при порівнянні з еталонною послідовністю (яка не включає добавлення або делеції). Спеціалісти в цій галузі техніки повинні звертатися до детальних способів, що використовуються при вирівнюванні послідовностей у пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics, реліз 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, штат Вісконсін, США) або звертатися до статті Ausubel et al. (1998) за детальним обговоренням аналізу послідовностей.

Як використовується у цьому документі, термін "отриманий з" відноситься до визначеної нуклеотидної послідовності, яка може бути отримана з конкретного визначеного джерела або виду, хоча не обов'язково безпосередньо з цього джерела або виду.

Термін "ендонуклеаза" або "ендонуклеаза рестрикції" відноситься до ферментів, які розщеплюють фосфодіестерний зв'язок у полінуклеотидному ланцюгу.

Термін "мегануклеаза" відноситься до ендодезоксирибонуклеаз, які характеризуються великим сайтом розпізнавання (послідовності дволанцюгових ДНК від 12 до 40 пар основ), та які в результаті розміру їхнього сайту розпізнавання звичайно зустрічаються рідко, якщо взагалі зустрічаються, у цьому геномі. Прикладами мегануклеаз є, але без обмеження, I-Anil, I-Scel, I-CeuI, PI-Pspl, PI-Sce, I-ScelV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-Crel, I-LtrI, I-GpI, I-GZel, I-OnuI, I-HjeMI, I-MsoI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII.

Термін "TAL-ефекторна нуклеаза" (TALEN) відноситься до нуклеази, яка включає TAL-ефекторний домен зв'язування ДНК, гібридизований з доменом нуклеази. TAL-ефекторні ДНК-зв'язуючі домени можуть бути сконструйовані для зв'язування потрібної мішені та гібридизовані з доменом нуклеази, таким як домен нуклеази FokI, для отримання гібридного білка TAL-ефекторного домена-нуклеази.

Термін "цинк-пальцева нуклеаза" (ZFN) відноситься до нуклеази, яка включає цинк-пальцевий домен зв'язування ДНК, гібридизований з доменом нуклеази, таким як домен нуклеази FokI. Цинк-пальцеві домени можуть бути сконструйовані для націлювання на потрібні

послідовності ДНК, і це дає змогу цинк-пальцевим нуклеазам націлюватися на унікальні послідовності у складних геномах.

Термін "розщеплення" відноситься до руйнування ковалентного скелету полінуклеотидної молекули, такої як молекула ДНК.

5 Як використовується у цьому документі, термін "шкідник" відноситься до комах, павукоподібних, ракоподібних, грибів, бактерій, вірусів, нематод, плоских червів, круглих червів, остриць, анкілостом, стрічкових червів, трипаносом, шистосом, оводів, мух, іксодових кліщів, кліщів і вошей та їм подібних, які поширені у середовищі існування людей, та можуть поглинатися або контактувати з однією або більше клітинами, тканинами або рідинами, продукованими хазяїном шкідника або симбіонтом.

10 Як використовується у цьому документі, термін "стійкість до шкідника" відноситься до здатності хазяїна шкідника або симбіонта протистояти атаці шкідника, який, як правило, здатний завдати ушкодження або шкоду хазяїну або симбіонту шкідника. Як описано у цьому документі така стійкість до шкідника може бути досягнута нанесенням на поверхню хазяїна або симбіонта шкідника молекули длРНК, складеної частково з сегмента РНК, який є ідентичним відповідному сегменту РНК, кодованому послідовністю ДНК шкідника, якій воліє харчуватися на хазяїні або симбіонті шкідника. Експресія гена шкідника-мішені супресується длРНК, а супресія експресії гена в організмі шкідника-мішені приводить до стійкості до шкідника хазяїна або симбіонта шкідника.

20 В. Продукція РНК

Цей опис відноситься до композицій та способів для ефективного та рентабельного продукування та доставки транскрибованих молекул РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК кодує білок. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК кодує регуляторну РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК є длРНК. В деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК містить як смисло-орієнтовані, так і антисмисло-орієнтовані сегменти, які утворюють стабілізовану щонайменше частково дволанцюгову молекулу РНК (длРНК), здатну супресувати цільовий ген. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК кодує білок. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована молекула РНК є регуляторною РНК.

30 длРНК

Деякі варіанти реалізації винаходу, описаних у цьому документі, відносяться до векторів та систем для продукування молекули РНК *in vivo* або *in vitro*, що містить перший сегмент РНК, зв'язаний з практично комплементарним другим сегментом РНК третім сегментом РНК. Перший та другий сегменти РНК лежать у межах довжини молекули РНК та мають практично інвертовані повтори один одного таким чином, що комплементарність між першим та другим сегментами РНК призводить до здатності цих двох сегментів гібридизуватися *in vivo* та *in vitro* для утворення дволанцюгового стебла РНК, зв'язаного разом на одному кінці з кожним з першого та другого сегментів третім сегментом РНК, що утворює одноланцюгову петлю. Перший та другий сегменти відповідають смисловій та антисмисловій послідовності, відповідно, проявляючи суттєву ідентичність нуклеотидній послідовності, націлених на супресію. В деяких варіантах реалізації винаходу молекула РНК додатково включає щонайменше другу утворюючу стебло-петлю ділянку, яка супресує щонайменше другу послідовність-мішень.

У деяких варіантах реалізації винаходу довжина смислового ланцюга РНК-дуплекса може мати щонайменше близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900 або більше нуклеотидів. Подібним чином, у деяких варіантах реалізації винаходу довжина антисмислового ланцюга РНК-дуплекса може мати щонайменше близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900 або більше нуклеотидів. Смысловий та антисмысловий ланцюги РНК-дуплекса не потребують точної комплементарності, а дволанцюгова РНК може містити внутрішні некомплементарні ділянки. Смысловий та антисмысловий ланцюги лише потрібні для утворення дуплекса або практичної комплементарності для ренатурації у біологічних умовах. У деяких варіантах реалізації винаходу, якщо дволанцюгова РНК утворюється від спарювання комплементарних основ смислового та антисмыслового ланцюгів, результуючий дуплекс має тупі кінці. В інших варіантах реалізації винаходу, якщо дволанцюгова РНК утворюється від спарювання комплементарних основ смислового та антисмыслового ланцюгів, длРНК має асиметричну структуру. В деяких варіантах реалізації винаходу длРНК має липкий 5'-кінець з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше нуклеотидів на смисловому ланцюгу. В інших варіантах реалізації винаходу

длРНК має липкий 5'-кінець з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше нуклеотидів на антисмисловому ланцюгу. В інших варіантах реалізації винаходу длРНК має липкий 3'-кінець з 1, 2, 3, 4, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше нуклеотидів на смисловому ланцюгу. В інших варіантах реалізації винаходу длРНК має липкий 3'-кінець з 1, 2, 3, 4, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше нуклеотидів на антисмисловому ланцюгу.

Третій сегмент РНК може містити будь-яку послідовність нуклеотидів, яка полегшує або дозволяє першому сегменту РНК або другому сегменту РНК гібридизуватися та утворювати длРНК. Третій сегмент РНК сегмент може містити послідовність нуклеотидів зі щонайменше близько 1-5 нуклеотидів у довжину, 5-10 нуклеотидів у довжину, 10-15 нуклеотидів у довжину, 15-20 нуклеотидів у довжину, 20-25 нуклеотидів у довжину, 25-30 нуклеотидів у довжину, 30-35 нуклеотидів у довжину, 35-40 нуклеотидів у довжину, 40-45 нуклеотидів у довжину, 45-50 нуклеотидів у довжину, 50-55 нуклеотидів у довжину, 55-60 нуклеотидів у довжину, 60-65 нуклеотидів у довжину, 65-70 нуклеотидів у довжину, 70-75 нуклеотидів у довжину, 75-80 нуклеотидів у довжину, 80-85 нуклеотидів у довжину, 85-90 нуклеотидів у довжину, 90-95 нуклеотидів у довжину, 95-100 нуклеотидів у довжину, 100-150 нуклеотидів у довжину, 150-200 нуклеотидів у довжину, 200-250 нуклеотидів у довжину, 250-400 нуклеотидів у довжину або щонайменше близько 400-500 нуклеотидів у довжину. Безліч різних послідовностей можуть слугувати петлевою послідовністю. Приклади специфічних петлевих послідовностей, для яких продемонстровано функціонування в мшРНК, включають UUCAAGAGA, CCACACC, AAGCUU, CTCGAG, CCACC та UUCG. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК практично відповідає смисловій або антисмисловій послідовності сегмента гена, націленого на супресію. Наприклад, третій сегмент РНК може містити послідовність нуклеотидів, що відповідає смисловим або антисмисловим нуклеотидам, розташованим на дистальному кінці сегмента гена, націленого самокомплементарністю першого та другого сегментів РНК. В інших варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК практично відповідає смисловій або антисмисловій послідовності сегмента нецільового гена. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК отримана з нуклеотидної послідовності петлевої ділянки мікроРНК (miRNA). В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК отримана з нуклеотидної послідовності петлевої ділянки нативної мікроРНК (miRNA) цільового організму. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК є сконструйованою нуклеотидною послідовністю. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК отримана з нуклеотидної послідовності нативного гена зміною вмісту GC. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність третього сегмента РНК кодує аптамер.

Будь-який ген може бути націленим на супресію молекулою длРНК, продукуюваною у відповідності з цими варіантами реалізації винаходу. Інгібування гена-мішені, використовуючи молекулу длРНК, як описано у цьому документі, є послідовність-специфічним для тих нуклеотидних послідовностей, які відповідають дуплекс-утворюючій ділянці длРНК, та є націленими на інгібування РНКі-опосередкованим інгібуванням. Дуплекс-утворююча ділянка длРНК може відповідати повнорозмірній нуклеотидній послідовності продукту первинної транскрипції або повністю процесованій мРНК гена-мішені, або дуплекс-утворююча ділянка длРНК може відповідати частині продукту первинної транскрипції або повністю процесованій мРНК гена-мішені. Нуклеотидна послідовність гена, націленого на супресію, що відповідає дуплекс-утворюючій ділянці длРНК, може розглядатися як "послідовність-мішень". Дуплекс-утворююча ділянка длРНК може відповідати частині гена-мішені, яка щонайменше має близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900 або 1000 нуклеотидів у довжину. В деяких варіантах реалізації винаходу дуплекс-утворююча ділянка длРНК може відповідати більше ніж близько 20-25 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 25-50 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 50-75 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 75-100 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 100-125 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 125-150 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 150-175 нуклеотидів гена-мішені, або послідовності більше ніж близько 175-200 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 200-250 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 250-275 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 275-300 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 300-325 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 325-350 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 350-400 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 400-450 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 450-500 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 500-550 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 550-600 нуклеотидів гена-мішені, більше ніж близько 600-700 нуклеотидів

гена-мішені або більше ніж близько 700-1000 нуклеотидів гена-мішені залежно від розміру гена-мішені. Довжина дуплекс-утворюючої ділянки може залежати від довжини молекул длРНК, здатних поглинатися організмом-мішенню, наприклад комахою, та довжини длРНК, здатної процесуватися всередині клітини організму-мішені на фрагменти, які керують РНК-інтерференцією. Довжина дуплекс-утворюючої ділянки також може зазнавати впливу від способу синтезу длРНК.

В деяких варіантах реалізації винаходу дуплекс-утворююча ділянка молекули длРНК має точну комплементарність (100 %) послідовності-мішені. Проте, абсолютна ідентичність послідовностей між дуплекс-утворюючою ділянкою молекули длРНК та послідовністю-мішенню не потрібна. Варіації послідовностей, що можуть очікуватися через генетичну мутацію, поліморфізм штамів або еволюційну дивергенцію є допустимими, а длРНК, яка містить дуплекс-утворюючу нуклеотидну послідовність з інсерціями, делеціями та одноточковими мутаціями відносно послідовності-мішені, може використовуватися для інгібування гена-мішені. Нуклеотидні послідовності дуплекс-утворюючої ділянки длРНК, як описано у цьому документі, та відповідна частина гена-мішені можуть бути практично комплементарними, наприклад, послідовність може мати долю щонайменше близько 80 % ідентичності, щонайменше близько 90 % ідентичності, щонайменше близько 95 % ідентичності, щонайменше близько 96 % ідентичності, щонайменше близько 97 % ідентичності, щонайменше близько 98 % ідентичності або щонайменше близько 99 % ідентичності разом з послідовністю, яка є мішенню. Дуплекс-утворююча ділянка длРНК, описана у цьому документі, також може бути функціонально визначена як нуклеотидна послідовність, що здатна гібридизуватися з частиною транскрипта гена-мішені. Збільшена довжина може компенсуватися меншою гомологією між дуплекс-утворюючою ділянкою молекули длРНК та її послідовністю-мішенню. Довжина ідентичних нуклеотидних послідовностей може складати щонайменше близько 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 або щонайменше близько 1000 основ.

Дуплекс-утворююча ділянка молекули длРНК може бути розроблена проти будь-якої послідовності-мішені, включаючи одну або більше послідовностей-мішеней, вибраних з гена, нативного щодо шкідника або патогену. Послідовність-мішень може бути вибрана з гена, нативного еукаріотичному організму або нееукаріотичному організму. Послідовність-мішень може включати будь-яку послідовність з будь-яких видів, включаючи, але без обмеження, бактерії; віруси; гриби; рослини, включаючи однодольні та дводольні, такі як культурні рослини, декоративні рослини та неокультурені або дикі рослини; безхребетні, такі як членистоногі, кільчасті черви, нематоди та молюски, та хребетні, такі як амфібії, риби, птахи або ссавці.

Послідовність-мішень може бути здатною до трансляції (кодуючою) послідовністю або може бути некодуючою (такою як некодуюча регуляторна послідовність) або ними обома. Необмежуючі приклади не здатної до трансляції (некодуючої) послідовності-мішені включають: 5'-нетрансльовані ділянки, промотори, енхансери або інші некодуючі транскрипційні ділянки, 3'-нетрансльовані ділянки, термінатори та інтрони. Послідовності-мішені також можуть включати гени, що кодують мікроРНК, малі інтерферуючі РНК, РНК-компоненти рибосом або рибозимів, малі ядерцеві РНК або інші некодуючі РНК (див., наприклад, некодуючі послідовності РНК, представлені у відкритому доступі на сайті rfam.wustl.edu; у статтях Erdmann et al. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:189-193; Gottesman (2005) *Trends Genet.*, 21:399-404; Griffiths-Jones et al. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:121-124, які включені як посилання). Необмежуючі приклади не здатної до трансляції (некодуючої) послідовності-мішені включають: кодуючі фактори транскрипції гени, кодуючі рецептори гени, кодуючі гормони гени, конститутивні гени та кодуючі ферменти гени, задіяні у біосинтезі або катаболізмі цільових молекул (таких як, але без обмеження, амінокислоти, жирні амінокислоти та інші ліпіди, цукри та інші вуглеводи, біологічні полімери та вторинні метаболіти, включаючи алколоїди, терпеноїди, полікетиди, нерибосомальні пептиди та вторинні метаболіти змішаного біосинтетичного походження). Додатково, нуклеотидні послідовності-мішені можуть бути визначені з будь-якої рослинного, комахового, вірусного, бактеріального або грибного гена, функцію якого було встановлено з літератури. Мається на увазі, що у виборі генів-мішеней можуть використовуватися кілька критеріїв. Наприклад, нуклеотидні послідовності-мішені можуть бути визначені з генів, що грають важливі ролі у забезпеченні життєздатності, росту, розвитку, репродукції та інфекційності. Ці гени можуть бути ідентифіковані за летальними нокаутуючими мутаціями у *Drosophila*, *C. elegans* або інших організмів. Ген також може бути тим, білковий продукт якого має швидку інтенсивність обороту, таким чином, що інгібування длРНК буде призводити до швидкого зменшення рівнів білка. В деяких варіантах реалізації винаходу переважним є вибір гена, для якого невелике падіння рівня експресії призводить до згубних впливів для організму.

В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, нативного для комахи. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з гена, нативного для будь-якого виду комахи, що викликає ушкодження культурних рослин та наступні втрати урожаю (комаха-шкідник). Необмежуючі приклади шкідників-комах включають: попилицю кукурудзяну листову, совку трав'яну, совку африканську, совку бавовняну, цикадку зернову, моль-пестрянку, західного кукурудзяного жука, північного кукурудзяного жука, мексиканського кукурудзяного жука, південного кукурудзяного жука, совку, личинку жужелиці, проволочника, личинку стеблового пильщика хлібного, жука-блошку одинадцятиточкову, клопа-щитника зеленого, клопа-щитника коричневого, попилицю соєву та соєвого стеблового точильника. Гени комах можуть бути мішенями на стадіях зрілої комахи (дорослої), незрілої комахи (личинки) та яйця. В деяких варіантах реалізації винаходу ген, що є мішенню для супресії, може кодувати незамінний білок, передбачена функція якого вибрана з групи, що складається із забезпечення утворення м'язів, утворення ювенільних гормонів, регуляції ювенільних гормонів, регуляції і транспорту іонів, синтезу травних ферментів, підтримки потенціалу клітинної мембрани, біосинтезу амінокислот, розщеплення амінокислот, утворення сімені, синтезу феромонів, сприйняття феромонів, утворення антен, утворення крил, утворення ніг, розвитку та диференціації, утворення яєць, визрівання личинки, утворення травних ферментів, синтезу гемолімфи, підтримку гемолімфи, нейропередачі, поділу клітин, метаболізму енергії, дихання та апоптозу. Якщо послідовність-мішень отримана з гена, незамінного для життєздатності або інфекційності комахи, то її пригнічення призводить до зниження здатності комахи виживати та заражати свого хазяїна. Тому таке пригнічення в результаті призводить до "згубного ефекту" для підтримки життєздатності та інфекційності комахи по тій причині, що воно запобігає або знижує здатність комахи харчуватися та виживати на нутрієнтах, що отримані від клітин-хазяїв. Завдяки цьому зниженню життєздатності та інфекційності комахи покращується стійкість та/або полегшене перенесення інфекції, викликаной комахою. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, білковий продукт якого має швидку інтенсивність обороту, таким чином, що інгібування дЛРНК буде призводити до швидкого зменшення рівнів білка. В деяких варіантах реалізації винаходу переважним є вибір гена, для якого невелике падіння рівня експресії призводить для комахи до згубних впливів.

В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, що експресується у травному тракті комахи. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, що розділяє значну ступінь гомології з нуклеотидними послідовностями відомих генів, які експресуються у травному тракті, що кодують білкові компоненти протонної V-АТФази плазматичної мембрани (Dow et al., 1997, J. Exp. Biol., 200:237-245; Dow, Bioenerg. Biomemb., 1999, 31:75-83). Цей білковий комплекс є єдиним джерелом енергії епітеліального іонного транспорту та відповідає за залужування у просвіті середньої кишки. V-АТФаза також експресується у мальпігіївій судині, вирості задньої кишки, яка функціонує для підтримки балансу рідини та детоксикації чужорідними речовинами у спосіб, аналогічний органу нирок ссавців.

В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, що задіяний у процесах росту, розвитку та репродукції комах. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, що кодує ген CHD3. Ген CHD3 у *Drosophila melanogaster* кодує білок з АТФ-залежною ДНК-хеліказною активністю, яка задіяна у збірці/розбиранні хроматину у ядрі. Подібні послідовності були знайдені у різномірних організмах, таких як *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* та *Saccharomyces cerevisiae*. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, що кодує ген β -тубуліну. Родина генів β -тубуліну кодує білки, асоційовані з мікротрубочками, які є складовою частиною клітинного цитоскелета. Споріднені послідовності знайдені у таких різномірних організмах як *Caenorhabditis elegans* та *Manduca sexta*.

В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, нативного для шкідника-нематоди. Необмежуючі приклади шкідників-нематод включають: колумбійську бульбичкову нематоду, північну бульбичкову нематоду, південну бульбичкову нематоду, бульбичкову нематоду, несправжню бульбичкову нематоду, кукурудзяну цистоутворюючу нематоду, соєву цистоутворюючу нематоду, картопляну цистоутворюючу нематоду, цистоутворюючу нематоду цукрового буряка, нематоду-жало, кільцеву нематоду, спіральну нематоду, списову нематоду, кінджальну нематоду, голчасту нематоду, лезову нематоду, нематоду, що вражає короткі корені, нематоду, що викликає низькорослість, золотисту нематоду та нематоду, що викликає загнивання картоплі. В деяких варіантах реалізації винаходу ген, що є мішенню для супресії, може кодувати незамінний білок, передбачена

функція якого вибрана з групи, що складається із забезпечення утворення м'язів, регуляції і транспорту іонів, синтезу травних ферментів, підтримки потенціалу клітинної мембрани, біосинтезу амінокислот, розщеплення амінокислот, утворення сімені, розвитку та диференціації, утворення яєць, утворення травних ферментів, нейропередачі, поділу клітин, метаболізму енергії, дихання та апоптозу. Якщо послідовність-мішень отримана з гена, незамінного для життєздатності або інфекційності нематоди, то її пригнічення призводить до зниження здатності нематоди виживати та заражати свого хазяїна. Тому таке пригнічення в результаті призводить до "згубного ефекту" для підтримки життєздатності та інфекційності нематоди по тій причині, що воно запобігає або знижує здатність нематоди харчуватися та виживати на нутрієнтах, що отримані з клітин-хазяїв. Завдяки цьому зниженню життєздатності та інфекційності нематоди покращується стійкість та/або полегшене перенесення інфекції, викликаной комахою. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, білковий продукт якого має швидку інтенсивність обороту, таким чином, що інгібування длРНК буде призводити до швидкого зменшення рівнів білка. В деяких варіантах реалізації винаходу переважним є вибір гена, для якого невелике падіння рівня експресії призводить для нематоди до згубних впливів.

В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, нативного для грибу. Необмежуючі приклади грибів включають: *Macrophomina phaseolina*, *Puccinia sorghi*, *Ustilago maydis*, *Exserohilum pedicellatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium verticillioides* та *Sphacelotheca reiliana*. В деяких варіантах реалізації винаходу ген, що є мішенню для супресії, може кодувати незамінний білок, передбачена функція якого вибрана з групи, що складається із забезпечення поділу клітин, метаболізму енергії, утворення клітинних стінок, утворення спор, утворення гіфів та синтезу травних ферментів. Якщо послідовність-мішень отримана з гена, незамінного для життєздатності або інфекційності гриба, то її пригнічення призводить до зниження здатності гриба виживати та заражати свого хазяїна. Тому таке пригнічення в результаті призводить до "згубного ефекту" для підтримки життєздатності та інфекційності гриба по тій причині, що воно запобігає або знижує здатність гриба харчуватися та виживати на нутрієнтах, що отримані від клітин-хазяїв. Завдяки цьому зниженню життєздатності та інфекційності гриба покращується стійкість та/або полегшене перенесення інфекції, викликаной грибом. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена, білковий продукт якого має швидку інтенсивність обороту, таким чином, що інгібування длРНК буде призводити до швидкого зменшення рівнів білка. В деяких варіантах реалізації винаходу переважним є вибір гена, для якого невелике падіння рівня експресії призводить для гриба до згубних впливів.

В деяких варіантах реалізації винаходу може бути потрібним, щоб длРНК інгібувала експресію цільового гена в більше ніж одному виді. В деяких варіантах реалізації винаходу може бути потрібним інгібувати експресію цільового гена в двох або більше видах, наприклад, видах злакового кореневого черв'яка. В таких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з гена або частини гена, що є висококонсервативним серед вибраних видів. Наприклад, нуклеотидна послідовність може бути вибрана з гена або частини гена, що має щонайменше близько 80 % ідентичності, близько 85 % ідентичності, щонайменше близько 90 % ідентичності, щонайменше близько 95 % ідентичності, щонайменше близько 96 % ідентичності, щонайменше близько 97 % ідентичності, щонайменше близько 98 % ідентичності або щонайменше близько 99 % ідентичності серед вибраних видів.

В деяких варіантах реалізації винаходу може бути потрібним, щоб длРНК проявляла видоспецифічну активність. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з нативного гена або частини нативного гена з цільових видів, що мають низький ступінь ідентичності послідовностей з відповідними генами у інших видів. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з гена або частини гена, якщо ступінь ідентичності послідовностей з відповідними генами у інших видів становить менше ніж близько 80 %. В інших варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з гена або частини гена, якщо ступінь ідентичності послідовностей з відповідними генами у інших видів становить менше ніж близько 70 %. В інших варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з гена або частини гена, якщо ступінь ідентичності послідовностей з відповідними генами у інших видів становить менше ніж близько 60 %. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень вибирають з гена або частини гена, що є слабоконсервативним серед окремих видів комах або серед комах та інших організмів. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з нативного гена цільових видів, що не мають відомих гомологів у інших організмів. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність-мішень може вибиратися з нативного гена цільових видів, що не мають відомих гомологів у рослині або хребетної тварини.

Вектори та експресія

Декілька варіантів реалізації винаходу, описаних у цьому документі, відносяться до сконструйованої експресійної конструкції для транскрипції РНК *in vivo* та *in vitro*, яка містить промотор, функціонально зв'язаний з РНК-кодуючим елементом. У деяких варіантах реалізації винаходу РНК може бути длРНК. У інших варіантах реалізації винаходу РНК може кодувати білок або бути регуляторною РНК. Сконструйовані експресійні конструкції, описані у цьому документі, переважно утворюють частину здатного до реплікації вектора. У варіантах реалізації винаходу, описаних у цьому документі, ефективність продукування РНК на сконструйованій РНК-експресійній конструкції покращена запобіганням або мінімізацією небажаної транскрипції РНК на векторному скелеті. Розглядається декілька шляхів запобігання або мінімізації небажаної транскрипції векторного скелета і вони можуть використовуватися незалежно або у комбінації. В деяких варіантах реалізації винаходу дві або більше послідовностей транскрипційного термінатора функціонально зв'язані з промотором у прямому напрямку зчитування 3'-кінця РНК-кодуючого елемента. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність нуклеїнової кислоти, яка утворює вторинну структуру, що містить дві або більше сусідніх шпильок середнього розміру функціонально зв'язані з промотором у прямому напрямку зчитування 3'-кінця РНК-кодуючого елемента. В деяких варіантах реалізації винаходу один або більше сайтів рестрикції, які переважно не знайдені у геномі хазяїна, представлені на 3'-кінці до РНК-кодуючого елемента. Розщеплення при рестрикції запобігає небажаній транскрипції у прямому напрямку зчитування за сайтом розрізання. В деяких варіантах реалізації винаходу синтетична нуклеотидна послідовність, що кодує РНК-транскрипт, який може утворювати одну або більше стебло-петлевих структур через спарювання комплементарних основ та функціонально зв'язаний з промотором у прямому напрямку зчитування 3'-кінця РНК-кодуючого елемента. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, що кодує один або більше сайтів зв'язування длРНК-зв'язуючого білка, представлена на 3'-кінці до РНК-кодуючого елемента. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить Rho-залежний сигнал термінації. В деяких варіантах реалізації винаходу розмір векторного скелета зменшений для мінімізації небажаної транскрипції.

У варіантах реалізації винаходу, описаних у цьому документі, сконструйована експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає: смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично ідентична послідовності-мішені, антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, та нуклеотидну послідовність, яка фланкована комплементарними смисловою та антисмисловою нуклеотидними послідовностями, що кодує один або більше нуклеотидів, які виключені з утворення дуплекса комплементарних ділянок у РНК-транскрипті. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично ідентична послідовності-мішені, нуклеотидну послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, та антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна смисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності. В інших варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна послідовності-мішені, нуклеотидну послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, та смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна антисмисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності. Орієнтація нуклеотидної послідовності, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, може бути або смисловою або антисмисловою. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, практично ідентична частині смислової або антисмислової послідовності гена, що є мішенню для супресії молекулою длРНК. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, практично ідентична частині смислової або антисмислової послідовності гена відмінного від гена, що є мішенню для супресії молекулою длРНК. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, є сконструйованою нуклеотидною послідовністю. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, яка кодує петлеву ділянку молекули длРНК, кодує аптамер.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично ідентична нуклеотидній

послідовності щонайменше частини гена-мішені, та антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка коротша за смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність та практично комплементарна у напрямку 5'-кінця смисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично ідентична нуклеотидній послідовності частини гена-мішені та довша за антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна нуклеотидній послідовності щонайменше частини гена-мішені, та яка включає на своєму 3'-кінці нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна смисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна щонайменше частині нуклеотидній послідовності гена-мішені, та смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка коротша за антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність та яка практично комплементарна у напрямку 5'-кінця антисмисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючим елементом, що включає у напрямку від 5' до 3': антисмисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна частині нуклеотидній послідовності гена-мішені та довша за смисло-орієнтовану нуклеотидну послідовність, яка практично ідентична щонайменше частині гена-мішені та включає на своєму 3'-кінці нуклеотидну послідовність, яка практично комплементарна антисмисло-орієнтованій нуклеотидній послідовності.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з білок-кодуючим елементом.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить промотор, функціонально зв'язаний з елементом, кодуючим регуляторну РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу регуляторну РНК вибирають з групи, що складається з антисмислової РНК, РНК CRISPR, довгої некодуючої РНК, мікроРНК, РНК, що взаємодіють з білками рiwi, малі інтерферуючі РНК та РНК, що діють у транс-положенні.

Промотор, який використовується у сконструйованій РНК-експресійній конструкції, може вибиратися на основі природи системи експресії, в якій очікується функціонування сконструйованої РНК-експресійної конструкції (наприклад, прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн). Промотор може бути конститутивним або індукційним промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор бактеріофага, наприклад, T7, T3, SV40 або SP6, може використовуватися у сконструйованій РНК-експресійній конструкції, оскільки вони забезпечують високий рівень транскрипції, що залежить лише від зв'язування відповідної РНК-полімерази. Якщо клітина-хазяїн не експресує відповідну РНК-полімеразу, то трансген, який кодує полімеразу T7, T3, SV40 або SP6, функціонально зв'язану з промотором, розпізнаваним клітиною-хазяїном, може бути представленим на тому самому або іншому векторі, такому як сконструйована РНК-експресійна конструкція. Промотор, розпізнаваний клітиною-хазяїном, може бути індукційним промотором або конститутивно активним промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу в сконструйованій РНК-експресійній конструкції може використовуватися сингенний промотор, що розпізнається полімеразами, експресованими геномом хазяїна. Приклади промоторів, придатних для використання з бактеріальними хазяями, включають, але без обмеження, T5, промотор β -лактамази, промотор галактози *E. coli*, промотор арабінози, промотор лужної фосфатази, промотор триптофану (*trp*), промотор лактозного оперону (*lac*), промотор *lacUV5*, промотор *trc* та промотор *tac*. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор, який використовується у сконструйованій РНК-експресійній конструкції, може бути промотором РНК-Pol I, РНК-Pol II або РНК-Pol III. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор, який використовується у сконструйованій РНК-експресійній конструкції, може бути промотором РНК-Pol III. Приклади промоторів Pol III включають, але без обмеження, промотор U6, промотор тРНК, ретровірусний промотор LTR, промотор аденовіруса VA1, промотор РНК 5Sr, промотор РНК 7SK, промотор РНК 7SL та промотор РНК H1. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор, розпізнаваний дріжджами, наприклад промотор ADR1, промотор дикого типу α -фактору або гібридний промотор ADH2/GAPD, можуть використовуватися у сконструйованій длРНК-експресійній конструкції.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція може необов'язково додатково включати додаткові нуклеотидні послідовності, які переважно впливають на транскрипцію РНК-кодуючого елемента та/або стабільність результуючого

транскрипту. Наприклад, сконструйована РНК-експресійна конструкція може додатково містити одну або більше енхансерних послідовностей або послідовностей поліаденілювання.

Два основні механізми, названі Rho-незалежною та Rho-залежною термінацією, опосередковують транскрипційну термінацію у прокариот, таких як *E. coli*. Сигнали Rho-незалежної термінації, такі як послідовності транскрипційної термінації, обговорені нижче, не потребують зовнішнього фактора термінації-транскрипції, так як утворення стебло-петлевої структури у РНК, транскрибованої з цих послідовностей разом з блоками залишків уридину (U) сприяє вивільненню РНК-ланцюга з комплексу транскрипції. З іншого боку, Rho-залежна термінація потребує фактор термінації-транскрипції, названий Rho та елементів на мРНК, що діють у цис-положенні. Початковий сайт зв'язування, сайт Rho-утилізації (*rut*), поширюється на (~70 нуклеотидів, інколи 80–100 нуклеотидів) одноланцюгової ділянки, яка характеризується високим вмістом цитидину/низьким гуанозину та відносно малою вторинною структурою у РНК, що синтезується у зворотному напрямку фактичної послідовності термінатора. Коли зустрічається сайт зупинки полімерази, то відбувається термінація і транскрипт вивільняється під дією Rho-хеліказної активності.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить Rho-залежний сигнал термінації. В деяких варіантах реалізації винаходу Rho-залежний сигнал термінації розташований на петле-утворюючій ділянці длРНК-транскрипту. В інших варіантах реалізації винаходу Rho-залежний сигнал термінації розташований на смисловій або антисмисловій послідовності дуплекс-утворюючій ділянці длРНК-транскрипту. Послідовності нуклеїнових кислот, які кодують Rho-залежні сигнали термінації, відомі у цій галузі техніки, та можуть бути ідентифікованими у генах, що термінуються Rho-залежним шляхом. У деяких варіантах реалізації винаходу Rho-залежний сигнал термінації може вводитися у поєднанні з однією або більше з: Rho-незалежної послідовності термінатора, синтетичної нуклеотидної послідовності, яка кодує утворюючий стебло-петлю РНК-транскрипт, сайту зв'язування для ДНК-зв'язуючого білка та сайту рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, як описано нижче. Сконструйована РНК-експресійна конструкція, що включає Rho-залежний сигнал термінації, може експресуватися у клітині-хазяїні, що експресує Rho-фактори, що діють у транс-положенні (лінія клітин Rho+).

В деяких варіантах реалізації винаходу ефективність транскрипції РНК на сконструйованій експресійній конструкції може бути покращена шляхом забезпечення того, що послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить дві або більше шпильок у положенні 3' до кінця РНК-кодуючого елемента. Не бажаючи бути зв'язаними з конкретною теорією, автори передбачають, що вторинна структура дестабілізує комплекс елонгації транскрипції та призводить до того, що полімераза дисоціює від ДНК-матриці, завдяки чому мінімізується непродуктивна транскрипція нефункціональної послідовності та підвищується транскрипція потрібної РНК. Відповідно, послідовність термінатора може доповнюватися тим, що вона утворює вторинну структуру, яка містить дві або більше сусідніх шпильок. Звичайно шпилька може створюватися завдяки паліндромній нуклеотидній послідовності, що може згорнутися назад на саму себе з утворенням спареної стеблової ділянки, гілки якої з'єднані одноланцюговою петлею. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність термінатора містить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше сусідніх шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу сусідні шпильки розділені 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 неспареними нуклеотидами. В деяких варіантах реалізації винаходу шпилькове стебло містить у довжину 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 або більше пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу шпилькове стебло має у довжину від 12 до 30 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу термінаційна послідовність містить дві або більше шпильок середнього розміру, які мають стеблову ділянку, що включає близько від 9 до 25 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу шпилька містить петле-утворюючу ділянку з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу петле-утворююча ділянка містить 4-8 нуклеотидів. Не бажаючи бути зв'язаними з конкретною теорією, автори передбачають, що стабільність вторинної структури може корелювати з ефективністю термінації. Стабільність шпильок визначається їх довжиною, кількістю невідповідностей спарювання або вигинів, які містять шпильки, та складу основ на ділянці спарювання. Пари між гуаніном та цитозином мають три водневі зв'язки та є більш стабільними, порівнюючи з парами аденіну-тиміну, які мають лише два зв'язки. Вміст G/C шпилько-утворюючої паліндромної нуклеотидної послідовності може становити щонайменше 60 %, щонайменше 65 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або більше. В деяких варіантах реалізації винаходу вміст G/C шпилько-утворюючої паліндромної нуклеотидної послідовності може становити

щонайменше 80 %. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовність термінатору отримують з однієї або більше послідовностей транскрипційних термінаторів прокариотичного, еукаріотичного або фагового походження. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, кодує блоки з 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше аденінів (A), представлених на 3'-кінці до послідовності термінатору.

В деяких варіантах реалізації винаходу ефективність транскрипції РНК на сконструйованій РНК-експресійній конструкції може бути покращена шляхом введення двох або більше послідовностей транскрипційної термінації у тандемі у положенні 3' до кінця РНК-кодуючого елемента. Див. Фіг. 1. В деяких варіантах реалізації винаходу ефективність транскрипції РНК на сконструйованій РНК-експресійній конструкції може бути покращена шляхом введення трьох, чотирьох, п'яти або більше послідовностей транскрипційної термінації у тандемі у положенні 3' до кінця РНК-кодуючого елемента. Послідовність транскрипційної термінації може бути будь-якою нуклеотидною послідовністю, яка при транскрипційному розміщенні у прямому напрямку зчитування нуклеотидної послідовності, що кодує відкриту рамку зчитування, викликає завершення транскрипції відкритої рамки зчитування. Такі послідовності відомі у цій галузі техніки та можуть бути прокариотичного, еукаріотичного або фагового походження. Приклади послідовностей термінаторів включають, але без обмеження, РТН-термінатор, термінатор рЕТ-T7, термінатор Т3-Тф, термінатор рBR322-P4, термінатор вірусу везикулярного стоматиту, термінатор *glnB-TI*, термінатор *glnC*, транскрипційний термінатор TTadс та послідовності термінаторів, розпізнавані дріжджами, такі як термінатор транскрипції *Matα* (α-фактор), нативна послідовність термінації транскрипції α-фактора, послідовність термінації транскрипції *ADR1*, послідовність термінації транскрипції *ADH2* та послідовність термінації транскрипції *GAPD*. Невичерпний перелік послідовностей транскрипційних термінаторів може знаходитися у реєстрі iGEM, який доступний на сайті: <http://partsregistry.org/Terminators/Catalog>. Перша послідовність транскрипційного термінатора з блоків із 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше може розміщуватися безпосередньо на 3'-кінці до кінцевого нуклеотида длРНК-кодуючого елемента або на відстані щонайменше 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-1000 або більше нуклеотидів на 3'-кінці до кінцевого нуклеотида длРНК-кодуючого елемента. Кількість нуклеотидів між тандемними послідовностями транскрипційних термінаторів може варіювати, наприклад, послідовності транскрипційних термінаторів можуть розділятися 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50 або більше нуклеотидами. В деяких варіантах реалізації винаходу послідовності транскрипційних термінаторів можуть вибиратися на основі їхньої передбаченої вторинної структури, як визначено алгоритмом передбачення структури. Програми структурного передбачення добре відомі у цій галузі техніки та включають, наприклад, CLC Main Workbench.

Послідовності транскрипційних термінаторів можуть бути полімеразо-специфічними або неспецифічними, однак транскрипційні термінатори, вибрані для використання у цих варіантах реалізації винаходу, повинні утворювати "функціональну комбінацію" з вибраним промотором, що означає, що послідовність термінатора повинна бути здатною зупиняти транскрипцію за типом РНК-полімерази, яка зініціюється на промоторі. Наприклад, промотор еукаріотичної РНК-pol II та термінатори еукаріотичної РНК-pol II, промотор Т7 та термінатори Т7, промотор Т3 та термінатори Т3, промотор, розпізнаваний дріжджами, та послідовності термінаторів, розпізнавані дріжджами, і т.п. звичайно можуть утворювати функціональну комбінацію. Кількість та ідентичність використовуваних послідовностей транскрипційної термінації також можуть вибиратися на основі ефективності, з якою транскрипція термінується за цим промотором. Наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше гомологічних або гетерологічних послідовностей транскрипційних термінаторів можуть транскрипційно вводитися у прямому напрямку зчитування РНК-кодуючого елемента, для досягнення ефективності термінації щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % за цим промотором.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до сконструйованої експресійної конструкції, яка містить промотор та два або більше транскрипційних термінаторів у функціональній комбінації для ефективною термінації транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу, промотор Т7, РТН-термінатор та термінатор рЕТ-T7 утворюють функціональну комбінацію. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор Т7, термінатор *gln BT2*, термінатор РЕТ, РТН-термінатор та термінатор рЕТ-T7 утворюють функціональну комбінацію. В деяких варіантах реалізації винаходу термінаторні послідовності модифікують для видалення

нешпилько-утворюючої послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу термінаторні послідовності модифікують для видалення невідповідностей спарювання на стебловій ділянці шпильок. В деяких варіантах реалізації винаходу термінаторні послідовності модифікують для збільшення вмісту G-C шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з одним або більше Rho-залежними сигналами термінації та однією або більше Rho-незалежними послідовностями термінаторів. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з одним або більше Rho-залежними сигналами термінації та репресором TrpR. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з одним або більше Rho-незалежними сигналами термінації та репресором TyrR. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з одним або більше Rho-незалежними сигналами термінації та репресором LacI. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з одним або більше Rho-незалежними сигналами термінації та репресором LacI. В деяких варіантах реалізації винаходу промотор T7, промотор T5, промотор T3 або промотор SP6 утворюють функціональну комбінацію з синтетичною послідовністю термінатору, яка утворює вторинну структуру, що містить дві або більше сусідніх шпильок середнього розміру.

Один механізм регулювання термінації транскрипції, відомий як внутрішня термінація, залучає утворення шпильково-петлевої структури у ланцюзі РНК під час транскрипції, що дестабілізує комплекс елонгації транскрипції (що залучає взаємодії між матрицею, транскриптом та РНК-полімеразою) та веде до дисоціації полімерази від ДНК-матриці. Відповідно, синтетична нуклеотидна послідовність може бути розроблена таким чином, щоб кодувати РНК-транскрипт, який утворює одну або більше шпилькових петлевих структур, які сприяють термінації транскрипції. В декількох варіантах реалізації винаходу, описаних у цьому документі, ефективність транскрипції РНК покращують введенням нуклеотидної послідовності, яка кодує РНК, що утворює вторинну структуру, яка включає дві або більше шпильок у прямому напрямку транскрипційного зчитування РНК-кодуєчого елемента. Звичайно шпилька може створюватися завдяки паліндромній нуклеотидній послідовності, що може згорнутися назад на саму себе з утворенням спареної стеблової ділянки, гілки якої з'єднані одноланцюговою петлею. В деяких варіантах реалізації винаходу синтетична нуклеотидна послідовність кодує 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше РНК-шпильок. У деяких варіантах реалізації винаходу синтетична нуклеотидна послідовність кодує послідовність полі-Т на 3'-кінці до шпилько-утворюючої паліндромної нуклеотидної послідовності. Стабільність шпильки може корелювати з ефективністю термінації, а стабільність шпильок визначається їх довжиною, кількістю невідповідностей спарювання або вигинів, які містять шпильки, та складу основ на ділянці спарювання. Пари між гуаніном та цитозином мають три водневі зв'язки та є більш стабільними, порівнюючи з парами аденіну-урацилу, які мають лише два зв'язки. В деяких варіантах реалізації винаходу стебло, яке кодується синтетичною нуклеотидною послідовністю, містить у довжину 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 або більше пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу стебло, яке кодується синтетичною нуклеотидною послідовністю, містить у довжину від 12 до 30 пар основ. У деяких варіантах реалізації винаходу шпилькою є шпилька середнього розміру, яка має стеблову ділянку, що містить близько від 9 до 25 пар основ. Петле-утворююча може містити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу петле-утворююча ділянка містить 4-8 нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу петле-утворююча ділянка містить 4 нуклеотиди. Вміст G/C шпилько-утворюючої паліндромної нуклеотидної послідовності може становити щонайменше 60 %, щонайменше 65 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або більше. В деяких варіантах реалізації винаходу вміст G/C шпилько-утворюючої паліндромної нуклеотидної послідовності може становити щонайменше 80 %. В деяких варіантах реалізації винаходу синтетична нуклеотидна послідовність, яка кодує 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше РНК-шпильок, може бути введена у прямому напрямку транскрипційного зчитування для РНК-кодуєчим елементом у поєднанні з однією або більше послідовностями транскрипційних термінаторів прокаріотичного,

еукаріотичного або фагового походження. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність кодує блоки з 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше урацилів (U), введених на 3'-кінці до шпилько-кодуючої послідовності.

Зупинка полімерази під час елонгації вважається важливим компонентом як у Rho-залежній так і Rho-незалежній термінації. ДНК-зв'язуючі білки можуть діяти як дорожні огорожі, що викликають зупинку комплексу елонгації транскрипції, що сприяє транскрипційній термінації. В деяких варіантах реалізації винаходу ефективність транскрипційної термінації покращується введенням одного або більше сайтів зв'язування ДНК-зв'язуючого білка на 3'-кінці до РНК-кодуючого елементу. В деяких варіантах реалізації винаходу один або більше сайтів зв'язування ДНК-зв'язуючого білка введені проксимально до послідовності транскрипційної термінації таким чином, що ефективність термінації покращується. В деяких варіантах реалізації винаходу один або більше сайтів зв'язування ДНК-зв'язуючого білка введені проксимально до синтетичної нуклеотидної послідовності, яка кодує нуклеотиди, що утворюють шпилькову петлю. В деяких варіантах реалізації винаходу один або більше сайтів зв'язування ДНК-зв'язуючого білка введені проксимально до Rho-залежного сайту термінації. Може бути використаний будь-який ДНК-зв'язуючий білок, при комплексуванні з ДНК, викликає зупинку комплексу елонгації транскрипції та дестабілізацію пухирця транскрипції. Наприклад, можуть використовуватися один або більше сайтів зв'язування репресора TrpR, репресора LacI або репресора TyrR. Інші приклади ДНК-зв'язуючих білків, які можуть діяти як транскрипційні репресори, включають PRH, Eve, Krüppel, TGIF, Mad, IRF-2, RP58, E2F-6, MeCP2 та MBD2. Якщо клітина-хазяїн не експресує ендogenous ДНК-зв'язуючий білок, то нуклеотидна послідовність, яка кодує ДНК-зв'язуючий білок, може бути введена у вектор, що містить сконструйовану РНК-експресійну конструкцію, або вона може бути введена у інший вектор та може експресуватися під контролем промотора, розпізнаваного клітиною-хазяїном, або фагового промотора, такого як T7, T3 або SP6. В декількох варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить один або більше сайтів рестрикції сайт-специфічної ендонуклеази, які не виявлені у геномі клітини-хазяїна, на 3'-кінці до РНК-кодуючого елемента таким чином, що експресія сайт-специфічної ендонуклеази у клітині-хазяїна запобігає небажаній транскрипції на сконструйованій РНК-експресійній конструкції у прямому напрямку зчитування сайту рестрикції шляхом розщеплення сконструйованої РНК-експресійної конструкції без руйнування геному клітини-хазяїна. Див., наприклад, Фіг. 8. Сайт-специфічна ендонуклеаза може бути мегануклеазою, цинк-пальцевої нуклеазою (ZFN) або TALE-ефекторною нуклеазою (TALEN). Приклади мегануклеаз включають, але без обмеження, I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellII, I-Crel, I-LtrI, I-GpiI, I-GZel, I-OnuI, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. Нуклеотидна послідовність, яка кодує сайт-специфічну ендонуклеазу, може бути введена у вектор, що містить сконструйовану РНК-експресійну конструкцію, або вона може бути введена у інший вектор. В деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна послідовність, яка кодує сайт-специфічну ендонуклеазу, може бути введена у вектор, що кодує РНК-полімеразу, наприклад, полімеразу T7, T3, SV40 або SP6, та необов'язково може бути функціонально зв'язаною з промотором, розпізнаваним клітиною-хазяїном. В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить один або більше сайтів розщеплення сайт-специфічними ендонуклеазами на 3'-кінці до однієї або більше послідовностей термінаторів. У деяких варіантах реалізації винаходу сконструйована РНК-експресійна конструкція містить один або більше сайтів рестрикції ZFN, сайтів рестрикції TALEN або сайтів рестрикції мегануклеаз, вибраних з групи, що складається з I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellII, I-Crel, I-LtrI, I-GpiI, I-GZel, I-OnuI, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII та I-TevIII, на 3'-кінці до однієї або більше послідовностей термінації транскрипції, вибраних з групи, що складається з РТН-термінатора, термінатора рЕТ-T7, термінатора T3-Tф, термінатора рBR322-P4, термінатора вірусу везикулярного стоматиту, термінатора rrnB-TI, термінатора rrnC, транскрипційного термінатора TTadс, термінатора транскрипції Мата (α-фактор), нативної послідовності термінації транскрипції α-фактора, послідовності термінації транскрипції ADR1, послідовності термінації транскрипції ADH2 та послідовності термінації транскрипції GAPD.

Сконструйовані РНК-експресійні конструкції, як описано у цьому документі, такі як викладені у SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 та 20, можуть бути сконструйовані зі складових елементів послідовностей та включені у придатний вектор, використовуючи стандартні методики рекомбінантних ДНК, добре відомі у цій галузі техніки. Для цієї мети доступно багато векторів та вибір належного вектора буде залежати, головним чином, від розміру нуклеїнової кислоти, яку потрібно вставити у вектор, та конкретної клітини-хазяїна, яку потрібно трансформувати цим

вектором. Приклади векторів, придатних для використання у відповідності з цими варіантами реалізації винаходу, включають, але без обмеження, плазмиди, косміди, пластоми, бактеріальні штучні хромосоми, дріжджові штучні хромосоми та бактеріофаги. Векторний скелет може містити різноманітні компоненти, залежно від функції вектора (ампліфікація ДНК або експресія ДНК) та конкретної клітини-хазяїна, з яким він сумісний. Наприклад, скелет вектора може містити один або більше сайтів розпізнавання ендонуклеаз рестрикції, що дозволяють виконати вставку молекули нуклеїнової кислоти у спосіб, що може забезпечити визначення, без втрати основної біологічної функції вектора, нуклеотидні послідовності, які кодують визначаємий маркер, такий як ген стійкості до антибіотиків, що придатний для використання для ідентифікації та відбору клітин, трансдукованих вектором, промоторну послідовність, яка керує експресією трансгена у клітині-хазяїні, та точку початку реплікації. Приклади доступних бактеріальних векторів включають, але не обмежуються ними, вектори pUC19, pUC18, pBluescript, pDEST, pBAD, pGEM, pGEX, pACYC184 та pBR322.

В деяких варіантах реалізації винаходу розмір векторного скелета мінімізують для зменшення величини матриці, доступної для небажаної транскрипції. В деяких варіантах реалізації винаходу мінімальний вектор, придатний для використання згідно з цими варіантами реалізації винаходу, не містить одного або більше визначених на основі білка маркерів, таких як маркери стійкості до антибіотиків, несуттєвого спейсера та сміттєвих послідовностей, що не кодують визначену функцію. В деяких варіантах реалізації винаходу мінімальний вектор, придатний для використання згідно з цими варіантами реалізації винаходу переважно містить сайт множинного клонування, визначаємий маркерний ген та точку початку реплікації. Мінімальний вектор, придатний для використання згідно з цими варіантами реалізації винаходу може бути меншим ніж 3 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,7 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,6 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,5 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,4 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,3 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,2 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,1 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 2,0 т.н. У деяких варіантах реалізації вектор є меншим ніж 1,9 т.н. У деяких варіантах реалізації винаходу одна або більше сконструйованих РНК-експресійних конструкцій та/або один або більше РНК-кодуючих елементів клонують у мінімальному векторі для досягнення мінімального розміру щонайменше 3 т.н.

Молекули РНК, кодовані сконструйованими експресійними конструкціями, описаними у цьому документі, можуть синтезуватися *in vitro* або *in vivo* у клітині-хазяїні. Ендогенні РНК-полімерази клітини-хазяїна можуть опосередковувати транскрипцію *in vivo*, або для транскрипції *in vivo* або *in vitro* може використовуватися клонувана РНК-полімераза, така як РНК-полімераза бактеріофага (наприклад, T3, T7, SV40, SP6).

Один або більше векторів, які містять сконструйовану експресійну конструкцію, як описано вище, можуть вводитися до широкого різноманіття прокаріотичних та еукаріотичних мікроорганізмів-хазяїв для продукування молекул РНК. Декілька варіантів реалізації винаходу, описаних у цьому документі, відносяться до клітини-хазяїна, що експресує РНК на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності. Придатні клітини-хазяї включають, але без обмеження, гриби, міцеліальні гриби, дріжджі, водорості та бактерії. Для запобігання деградації молекул длРНК, транскрибованих у клітині-хазяїні, може використовуватися хазяїн, дефектний по РНКазі III.

В деяких варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною. Придатні еукаріотичні клітини-хазяї включають, але без обмеження, клітини грибів, клітини водоростей, клітини комах та клітини рослин. Придатні клітини-хазяї грибів включають, але без обмеження, клітини дріжджів та клітини міцеліальних грибів.

В одному варіанті реалізації винаходу грибно клітина-хазяїн є дріжджовою. В одному варіанті реалізації винаходу дріжджі походять з одного з видів: *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* та *Yarrowia*. В деяких варіантах реалізації винаходу клітина дріжджів є *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia quercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stipitis*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* або *Yarrowia lipolytica*.

В інших варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною. Придатні прокаріотичні клітин включають грампозитивні, грамнегативні та грамваріабельні бактеріальні клітини. Придатні прокаріотичні клітини-хазяї включають, але без обмеження, види з: *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azobacter*,

Bacillus, Bifidobacterium, Brevibacterium, Butyrivibrio, Buchnera, Campestris, Campylobacter, Clostridium, Corynebacterium, Chromatium, Coprococcus, Escherichia, Enterococcus, Enterobacter, Erwinia, Fusobacterium, Faecalibacterium, Francisella, Flavobacterium, Geobacillus, Haemophilus, Helicobacter, Klebsiella, Lactobacillus, Lactococcus, Ilyobacter, Microbacterium, Mesorhizobium, Methylobacterium, Methylobacterium, Mycobacterium, Neisseria, Pantoea, Pseudomonas, Prochlorococcus, Rhodobacter, Rhodopseudomonas, Rhodopseudomonas, Roseburia, Rhodospirillum, Rhodococcus, Scenedesmus, Streptomyces, Streptococcus, Synnecoccus, Staphylococcus, Serratia, Salmonella, Shigella, Thermoanaerobacterium, Tropheryma, Tularensis, Temecula, Thermosynechococcus, Thermococcus, Ureaplasma, Xanthomonas, Xylella, Yersinia та Zymomonas. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є непатогенною для людей.

В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Bacillus, наприклад, B. thuringiensis, B. megaterium, B. subtilis, B. lentus, B. circulans, B. pumilus, B. lautus, B. coagulans, B. brevis, B. licheniformis, B. clausii, B. stearothermophilus та B. amyloliquefaciens. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Clostridium, наприклад, C. acetobutylicum, C. tetani E88, C. lituseburensense, C. saccharobutylicum, C. perfringens та C. beijerinckii. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Corynebacterium, наприклад, C. glutamicum та C. acetoacidophilum. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Escherichia, наприклад, E. coli. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є дефектним по РНКазі III штамом E. coli, наприклад, HT115 (DE3) E. coli. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом Erwinia spp., наприклад, E. uredovora, E. carotovora, E. ananas, E. herbicola, E. punctata та E. terreus. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Pantoea, наприклад, P. citrea та P. agglomerans. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Pseudomonas, наприклад, P. pudita, P. mevalonii та P. sp. D-0110. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Streptococcus, наприклад, S. equisimilis, S. pyogenes та S. uberis. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Streptomyces, наприклад, S. ambofaciens, S. avermitilis, S. coelicolor, S. aureofaciens, S. aureus, S. fungicidicus, S. griseus та S. lividans. В деяких варіантах реалізації винаходу бактеріальна клітина-хазяїн є видом роду Zymomonas, наприклад, Z. mobilis та Z. lipolytica.

В деяких варіантах реалізації винаходу мікроорганізми, такі як бактерії, водорості та гриби, як відомо населяють філоплану (поверхню листя рослин) та/або різосферу (ґрунт, оточуючий корені рослин) широкого різноманіття важливих культур, можуть бути бажаними клітинами-хазяями для продукування та доставки длРНК. Для запобігання деградації молекул длРНК, транскрибованих у мікроорганізмах-хазяях, може використовуватися хазяїн, дефектний по РНКазі III. Особливо заслуговують уваги мікроорганізми, такі як бактерії, наприклад, видів роду Bacillus (включаючи види та підвиди B. thuringiensis kurstaki HD-1, B. thuringiensis kurstaki HD-73, B. thuringiensis sotto, B. thuringiensis berliner, B. thuringiensis thuringiensis, B. thuringiensis tolworthi, B. thuringiensis dendrolimus, B. thuringiensis alesti, B. thuringiensis galleriae, B. thuringiensis aizawai, B. thuringiensis subtoxicus, B. thuringiensis entomocidus, B. thuringiensis tenebrionis та B. thuringiensis san diego); Pseudomonas, Erwinia, Serratia, Klebsiella, Xanthomonas, Streptomyces, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Methylophilus, Agrobacterium, Acetobacter, Lactobacillus, Arthrobacter, Azotobacter, Leuconostoc та Alcaligenes; грибів, особливо дріжджів, наприклад, види родів Saccharomyces, Cryptococcus, Kluyveromyces, Sporobolomyces, Rhodotorula та Aureobasidium. Особливо заслуговують уваги такі бактеріальні види фітосфери, як Pseudomonas syringae, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Acetobacter xylinum, Agrobacterium tumefaciens, Rhodobacter sphaeroides, Xanthomonas campestris, Rhizobium melioli, Alcaligenes eutrophus та Azotobacter vinlandii; та дріжджові види 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, Kluyveromyces veronae та Aureobasidium pollulans.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до системи для експресії клітин для продукування длРНК з покращеною транскрипційною ефективністю на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності. В одному аспекті винаходу представлений спосіб продукування длРНК шляхом культивування клітин-хазяїв, які включають сконструйовану експресійну конструкцію, як описано у цьому документі. В деяких варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн експресує длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, яка включає SEQ ID NO: 2. В інших варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн експресує длРНК на

сконструйованій експресійній конструкції, яка включає SEQ ID NO: 4. В інших варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн експресує длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, яка включає SEQ ID NO: 14. В інших варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн експресує длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, яка включає SEQ ID NO: 15. В інших варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн експресує длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, яка включає SEQ ID NO: 20. В деяких варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн є бактеріальною клітиною, наприклад, клітина *E. coli*, дефектна по РНКазі III.

В цій галузі техніки легко доступні способи застосування технологій рекомбінантних ДНК для приготування конструкції рекомбінантної ДНК та вектора, що кодує цільову молекулу РНК, та трансформації і створення клітин-хазяїв, які транскрибують цю молекулу РНК.

С. Застосування длРНК

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій та способів доставки до організму-мішені длРНК, транскрибованої на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище. В деяких варіантах реалізації винаходу длРНК синтезується *in vitro* на сконструйованій експресійній конструкції, та вводиться в організм-мішень. В інших варіантах реалізації винаходу длРНК, що вводиться в організм-мішень, транскрибується у клітині-хазяїні (*in vivo*) на сконструйованій експресійній конструкції.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу доставляння длРНК до організму-мішені, яке включає експресію длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, як описано вище, та введення транскрибованої у клітині-хазяїні длРНК в організм-мішень. У деяких варіантах реалізації винаходу транскрибована у клітині-хазяїні длРНК виділяється з клітини-хазяїна та очищається перед введенням в організм-мішень. Наприклад, длРНК може бути очищена з лізату клітин-хазяїв шляхом екстракції розчинником або смолою, осадженням, електрофорезом, хроматографією або їх комбінацією. Альтернативно, длРНК може бути використана з мінімальним очищенням або без очищення. Наприклад, в деяких варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн, що містить длРНК, транскрибовану на сконструйованій експресійній конструкції, або лізат, отриманий з длРНК-експресуючої клітини-хазяїна, вводиться в організм-мішень. У деяких варіантах реалізації винаходу длРНК супресує незамінний ген організму-мішені. В інших варіантах реалізації винаходу длРНК супресує незамінний ген шкідника або патогену організму-мішені. Наприклад, длРНК може супресувати вірусний ген.

Як описано вище, клітина-хазяїн, така як клітина бактерій або дріжджів, може бути сконструйована для продукування длРНК на сконструйованій експресійній конструкції, як описано у цьому документі. Ці клітини-хазяї можуть поїдатися шкідником-комахою або іншим цільовим організмом. При поглинанні длРНК може ініціювати РНКі-відповідь, що веде до деградації мРНК-мішені та, якщо мРНК-мішень кодує незамінний білок, ослаблення або загибель організму, що харчується. Як показано у прикладі 3, годування *in vitro* транскрибованими молекулами длРНК, які містять послідовності РНК колорадського картопляного жука (ККЖ), транскрибованими у бактеріях молекулами длРНК, які містять послідовності РНК ККЖ, або бактеріями, які експресують длРНК, що містять послідовності РНК ККЖ, транскрибовані на сконструйованій длРНК-експресійній конструкції, личинок ККЖ у всіх випадках призводить до загибелі або інгібування розвитку або диференціації личинок, які поглинають композиції длРНК. Усі препарати длРНК ККЖ показали значну активність проти личинок ККЖ з найнижчою концентрацією (0,00002 мг/мл) препаратів бактерій, які експресують длРНК ККЖ, інгібуючи 87,5 % величин росту ККЖ. Активність бактерій, які експресують длРНК, для інгібування росту та розвитку організму-мішені вказує, що клітини-хазяї, сконструйовані для ефективної експресії длРНК, як описано у цьому документі, можуть вводитися безпосередньо в організм-мішень, наприклад, при харчуванні, для супресії активності гена-мішені без необхідності додаткових стадій очищення РНК.

Клітина-хазяїн, яка у багатьох варіантах застосування є бактеріальною клітиною, клітиною дріжджів або водоростей, переважно повинна бути вбитою перед введенням в організм-мішень або введенням у джерело харчування організму-мішені. Наприклад, якщо бактерії, які експресують длРНК, використовують як біологічний пестицид, або знаходять інше застосування, в якому сконструйована клітина-хазяїна, яка експресує длРНК, використовується у навколишньому середовищі, де є ймовірним контакт з людиною або іншими ссавцями. Клітини-хазяї, які експресують длРНК, можуть бути вбиті будь-якими способами, що не призведуть до значної деградації длРНК. Наприклад, клітини-хазяї можуть бути вбиті тепловою обробкою, хімічною обробкою, наприклад, обробкою фенолом або формальдегідом, або механічним руйнуванням. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини-хазяї вбивають без значного лізису. В деяких варіантах реалізації винаходу клітини-хазяї, наприклад бактеріальні клітини,

нагрівають до температури, достатньої для загибелі клітин, не викликаючи лізису. Наприклад, клітини-хазяї можуть нагріватися до температури щонайменше 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C або щонайменше 75°C.

В деяких варіантах реалізації винаходу сконструйовану клітину-хазяїна, яка експресує длРНК, лізують, а лізат клітин вводять в організм-мішень або вводять у джерело харчування організму-мішені. Клітини-хазяї, які експресують длРНК, можуть бути лізовані будь-якими способами, що не призведуть до значної деградації длРНК. Наприклад, клітини-хазяї можуть бути лізовані заморожуванням-розтаюванням, обробкою хімічними речовинами, наприклад, детергентом, толуолом або гідроксидом натрію, ферментативною обробкою або механічним руйнуванням, наприклад, гомогенізацією. В деяких варіантах реалізації винаходу неочищений лізат вводять в організм-мішень або вводять у джерело харчування організму-мішені. В інших варіантах реалізації винаходу частково очищений лізат або виділену з клітини-хазяїна експресовану длРНК вводять в організм-мішень або вводять у джерело харчування організму-мішені.

Інший варіант реалізації винаходу відноситься до способів та композицій для запобігання або інгібування вірусного захворювання в організмі-мішені, наприклад, в організмі ссавця, птаха, членистоногого або риби. Спеціальні приклади організмів-мішеней включають, але без обмеження, свиней, корів, бізонів, коней, кіз, курей, перепелів, качок, гусей, індиків, креветок, великих креветок, лобстерів, крабів, медоносних бджіл, лососів, тіляпій, морських окунів, коропів та сомів. В одному варіанті реалізації винаходу длРНК, що містить нуклеотидну послідовність, яка комплементарна щонайменше частині РНК-транскрипта вірусного гена, вводиться в організм-мішень таким чином, що експресія цільового вірусного гена подавляється. В одному варіанті реалізації винаходу композиція антивірусної длРНК вводиться у джерело харчування або наноситься на поверхню джерела харчування, наприклад, культурної рослини, для споживання організмом-мішенню. В одному аспекті композиція антивірусної длРНК містить молекули длРНК, транскрибовані на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище. В іншому аспекті винаходу композиція антивірусної длРНК містить вбиті експресуючі длРНК клітини-хазяї, як описано нижче, або їхній лізат. У деяких варіантах реалізації винаходу нелізована вбита нагріванням бактеріальна клітина, що містить сконструйовану експресійну конструкцію, розроблену для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище, згодовується організму-мішені, вибраному з групи, що складається з ссавців, птахів, членистоногих або риб. В одному варіанті реалізації винаходу організм-мішень є креветкою або великою креветкою, а сконструйована експресійна конструкція кодує длРНК, яка містить нуклеотидну послідовність, що комплементарна щонайменше частині РНК-транскрипта гена вірусу білої плямистості, бакуловірусу нарвала, вірусу бакуловірусного некрозу залоз середньої кишки, вірусу гематопоетичного некрозу, вірусу захворювання жовтої голови, вірусу синдрому Таура, інфекційного вірусу міонекрозу, нодавірусу *Macrobrachium rosenbergii*, вірусу Лаема-Сінгха або вірусу Моріляна. В одному варіанті реалізації винаходу організм-мішень є рибою, а сконструйована експресійна конструкція кодує длРНК, яка містить нуклеотидну послідовність, що комплементарна щонайменше частині РНК-транскрипта гена вірусу епізоотичного гематопоетичного некрозу, іридовірусу персидського карася, герпес-вірусу золотої рибки, вірусу інфекційного гематопоетичного некрозу, вірусу вірусної геморагічної септицемії, вірусу весняної віремії коропа, інфекційного вірусу анемії лосося або вірусу вірусного некрозу нервової тканини.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій та способів для контролю зараження безхребетними шкідниками. В деяких варіантах реалізації винаходу представлена система доставки для доставки пестицидних композицій длРНК до безхребетних шкідників через їхній вплив на харчування, що містить пестицидні композиції длРНК. В одному варіанті реалізації винаходу пестицидні композиції длРНК вводяться у джерело харчування шкідника або наносяться на поверхню джерела харчування шкідника, наприклад культурної рослини, для споживання безхребетним шкідником. В одному аспекті винаходу пестицидні композиції длРНК містять очищені молекули длРНК, транскрибовані на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище. В іншому аспекті винаходу пестицидні композиції длРНК містять нелізовані вбиті експресуючі длРНК клітини-хазяї, як описано нижче. В іншому аспекті винаходу пестицидні композиції длРНК містять неочищений або мінімально очищений лізат експресуючих длРНК клітин-хазяїв, як описано нижче. Ці композиції на додачу до длРНК, клітин-хазяїв або лізату можуть містити додаткові допоміжні речовини, розчинники або носії.

Інший варіант реалізації винаходу відноситься до способів та композицій для інгібування поширення вірусного захворювання у популяції рослин, наприклад культурних рослин. Віруси рослин звичайно передаються до рослини вектором членистоногих або нематод. Тому, інфекція рослин, викликана вірусом, може бути інгібована супресуванням експресії вірусного гена у векторі членистоногих або нематод. Таким чином, представлені композиції та способи для інгібування експресії вірусного гена у векторі членистоногих або нематод. Один варіант реалізації винаходу відноситься до способу, який включає введення длРНК, причому длРНК містить нуклеотидну послідовність, яка комплементарна щонайменше частині РНК-транскрипта гена рослинного вірусу до вектора членистоногих або нематод таким чином, що експресія цільового вірусного гена подавляється. Цільовий РНК-транскрипт може походити з вірусу мозаїки канатника, вірусу мозаїки африканської маніоки, вірусу мозаїки люцерни, вірусу мозаїки різухи, вірусу помірної мозаїки ячменю, вірусу жовтої карликової ячменю, вірусу жовтої мозаїки ячменю, вірусу кучерявості верхівки буряку, вірусу західної жовтухи буряку, вірусу золотистої мозаїки бобів, вірусу кучерявості листя буряку, некротичного вірусу жовтих жилок буряку, вірусу буряку, що передається через ґрунт, вірусу західної жовтухи буряка, вірусу мозаїки костеру, бегомовірусу мозаїки маніоки, вірусу мозаїки кольорової капусти, вірусу мозаїки огірків, вірусу некрозу огірків, вірусу жовтухи гарбуза, що передається попелицями, вірусу деформації побігів какао, вірусу віяловості листя виноградної лози, вірусів, асоційованих зі скручуванням листя виноградної лози, вірусу А виноградної лози, вірусу В виноградної лози, вірусу кільцевої плямистості арахісу, вірусу плямистості ірису жовтого, вірусу мозаїки дикого сорго, вірусу інфекційної жовтухи салату, вірусу мозаїки салату, вірусу раннього потемніння гороху, вірусу кільцевої плямистості перцю, вірусу скручування листя картоплі, вірусу кучерявості верхівки картоплі, вірусу карликовості рису, вірусу нерівної карликовості рису, вірусу мозаїки пшениці, що передається через ґрунт, південного вірусу мозаїки бобів, вірусу латентної кільцевої плямистості полуниці, вірусу пір'яподібної крапчатості батату, вірусу мозаїки тютюну, вірусу брязковості тютюну, вірусу кільцевої плямистості тютюну, вірусу чорної кільцевої плямистості томату, вірусу хлоротичної плямистості томату, вірусу золотистої мозаїки томату, вірусу жовтої кучерявості листя томату, вірусу плямистого зів'янення томату, вірусу мозаїки бархатного тютюну або вірусу полосатої мозаїки пшениці. В одному варіанті реалізації винаходу композиція антивірусної длРНК вводиться у джерело харчування або наноситься на поверхню джерела харчування, наприклад, культурної рослини, для захоплення вірусним вектором. В одному варіанті реалізації винаходу композиція антивірусної длРНК містить очищені молекули длРНК, транскрибовані на сконструйованій експресійній конструкції, розробленій для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище. В іншому аспекті винаходу композиція антивірусної длРНК містить нелізовані вбиті експресуючі длРНК клітини-хазяї, як описано нижче. В іншому аспекті винаходу композиція антивірусної длРНК містить неочищений або мінімально очищений лізат експресуючих длРНК клітин-хазяїв, як описано нижче. Вектор членистоногих може бути вектором-вставкою, наприклад, попелиць, жуків, фульгорид, цикадок, повстянок, сліпняків, кліщів, трипсів та білокрилок. Ці композиції на додачу до длРНК, клітин-хазяїв або лізату можуть містити додаткові допоміжні речовини, розчинники або носії. Композиції, що містять експресуючий длРНК мікроорганізм, вбитий нагріванням, або його лізат повинні бути достатньо стабільними, щоб длРНК залишалася недеградованою та здатною до опосередкування механізму РНКі, навіть під впливом умов зовнішнього середовища тривалий час, який може становити період днів або тижнів.

У варіантах реалізації винаходу, описаних у цьому документі, длРНК може експресуватися мікроорганізмами, які містять сконструйовану експресійну конструкцію, розроблену для мінімізації непродуктивної транскрипції нефункціональної послідовності, як описано вище, а мікроорганізми або їхній лізат може наноситися на поверхню рослини або насіння або вводиться у насіння, корінь, стебло або листя фізичними способами, такими як ін'єкція або, у випадку насіння, просочування. Наприклад, доставка мікроорганізмів, що містять сконструйовану експресійну конструкцію, як описано у цьому документі, на поверхню рослини може відбуватися через застосування напилування. В одному варіанті реалізації винаходу може культивуватися бактерія або клітина дріжджів, сконструйована для продукування та накопичення длРНК, а продукти культивування, такі як вбита нагрівом бактерія або клітина дріжджів або їхній лізат, можуть формулюватися, у вигляді композиції, сумісної зі звичайною сільськогосподарською практикою. Природа будь-яких допоміжних речовин та фізична форма композиції може варіювати в залежності від природи оброблюваного субстрату. Наприклад, композиція може бути рідиною, яка наноситься щіткою або напильюється на або вдавлюється у субстрат, що обробляється, або може бути покриттям чи порошком, який наноситься на субстрат, що обробляється. Таким чином, в одному варіанті реалізації винаходу композиція

знаходиться у формі покриття придатної поверхні, до якої ця форма пристає, та в кінці кінців поглинається організмом-мішенню, таким як комаха або нематода, які приводяться у контакт з покриттям.

Напилення формуляцій на культурні рослини може включати відповідні клейкі та зволожуючі речовини для ефективного покриття листя, а також УФ-протектори для захисту дЛРНК від пошкодження УФ. Наприклад, може бути бажаним мати формуляцію вбитого нагріванням мікроорганізму, яка може допомогти диспергувати мікроорганізм у плівці на листовій поверхні або перемістити вбитий нагріванням мікроорганізм у міжклітинний простір листа, та/або яка може надати мікроорганізму певну властивість приставати до листа у вологих навколишніх умовах (стійкість до дощу). Такі добавки звичайно використовуються у виробництві біоінсектицидів та добре відомі спеціалістам у цій галузі техніки. Подібним чином, формуляції для застосування на ґрунті можуть включати гранульовані формуляції, які служать як принада для личинок ґрунтових комах-шкідників, таких як злаковий кореневий черв'як. Такі застосування можуть бути поєднаними з іншими інсектицидними препаратами, на біологічній основі або ні, для посилення захисту рослин від пошкодження при харчуванні комах. Наприклад, коли білки *Bacillus thuringiensis* (Bt) вводяться до харчування комах-шкідників, то вони мають механізм дії, що контролює чисельність комах-шкідника. Таким чином, декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до синергічних комбінацій композицій дЛРНК та способів, описаних у цьому документі, зі способами та композиціями з використанням Bt, які включають формуляції для зовнішнього застосування та трансгенні підходи для контролю зараження комахами.

Приклади рослин, для яких можуть застосовуватися способи та композиції, описані у цьому документі, включають, але без обмеження, люцерну, кріп, яблуню, абрикос, артишок, руколу, спаржу, авокадо, банан, ячмінь, боби, буряк, ожину, чорницю, броколі, брюссельську капусту, капусту, ріпак, диню, моркву, маніок, цвітну капусту, селеру, вишню, кінзу, цитрусові, кlementин, каву, кукурудзу, бавовну, огірок, ялину Дугласа, баклажан, цикорій салатний, ескаріоль, евкалипт, фенхель, інжир, гарбуз, виноград, грейпфрут, диню мускатну, хікаму, ківі, салат, цибулю-порей, лимон, лайм, сосну ладанну, манго, диню, гриби, горіхи, овес, бамію, цибулю, апельсин, декоративну рослину, папайю, петрушку, горох, персик, арахіс, груші, перець, хурму, сосну, ананас, банан, сливу, гранат, тополя, картоплю, гарбуз, айву, променисту сосну, радікію, редис, малину, рис, жито, сорго, південну сосну, сою, шпинат, кабачки, полуницю, цукровий буряк, цукровий очерет, соняшник, батат, ліквідамбар, мандарин, чай, тютюн, томати, газонну траву, виноградну лозу, кавун, пшеницю, батат та цукіні.

Способи та композиції, описані у цьому документі, можуть застосовуватися до однодольних та дводольних рослин, або можуть застосовуватися через фармацевтично прийнятні формуляції до хребетних або безхребетних тварин для того, щоб забезпечити певний рівень зниження експресії гена-мішені. Інгібування експресії гена-мішені може кількісно визначатися вимірюванням або ендогенної РНК-мішені або білка, продукованого трансляцією РНК-мішені, а наслідки інгібування можуть бути підтверджені дослідженням видимого фенотипу цільової клітини або організму. Методики для кількісного визначення РНК та білків добре відомі будь-якому середньому спеціалісту у цій галузі техніки. В деяких варіантах реалізації винаходу експресія гена-мішені інгібується на щонайменше 10 %, на щонайменше 33 %, на щонайменше 50 % або на щонайменше 80 %. В деяких варіантах реалізації винаходу експресія гена-мішені інгібується на щонайменше 90 %, на щонайменше 95 % або на щонайменше 99 % серед клітин цільового організму, таким чином досягається значне інгібування. Можна сказати, що відбувається значне інгібування, якщо введення дЛРНК в організм-мішень призводить до визначаємої зміни фенотипу (наприклад, припинення росту личинок, параліч або загибель і т.п.) або визначаємого збільшення ендогенної РНК та/або білка, що відповідає гену-мішені. Разом з тим, у деяких варіантах реалізації винаходу інгібування відбувається практично у всіх клітинах цільового організму, у деяких варіантах реалізації винаходу інгібування може відбуватися лише у підмножині клітин, що експресують цей ген. Наприклад, якщо цільовий ген відіграє незамінну роль у клітинах травного тракту, то інгібування цільового гена всередині цих клітин достатнє для виявлення потрібного згубного ефекту на комаху.

Наступні приклади представлені з метою ілюстрації та не повинні тлумачитися як обмеження.

Приклад 1

Розробка вектора для продукування дЛРНК

Послідовність-мішень, нуклеотиди 30-309 SEQ ID NO 1, вибирали з передбачуваного ортолога коатомера COPI колорадського картопляного жука (ККЖ).

SEQ ID NO 1:

```
>Ld_F38E11.5 передбачуваний ортолог коатомера COPI; Alias Ld248; 14810:1..379
CGTAACCGCGGTTTGTTCACCCCTGAACCTACCTGTGGCTCTCACAGGCAGCGAAGATGG
TACCGTTAGAGTTTGGCATACGAATACACACAGATTAGAGAATTGTTTGAATTATGGGTT
CGAGAGAGTGTGGACCATTTGTTGCTTGAAGGGTTCAATAATGTTTCTCTGGGGTATGA
CGAGGGCAGTATATTAGTGAAAGTTGGAAGAGAAGAACCGGCAGTTAGTATGGATGCCAG
TGGCGGTAAAATAATTTGGGCAAGGCACCTCGGAATTACAACAAGCTAATTTGAAGGCGCT
GCCAGAAGGTGGAGAAAATAAGAGATGGGGAGCGTTTACCTGTCTCTGTAAAAGATATGGG
AGCATGTGAAATATACCCCT
```

- Розробили длРНК-кодуючий елемент, який містив смислову послідовність (нуклеотиди 4-283 SEQ ID NO 2), що відповідає послідовності-мішені коатомера COPI ККЖ, петле-кодуючу послідовність зі 150 нуклеотидів (нуклеотиди 284-433 SEQ ID NO 2) та антисмислову послідовність (нуклеотиди 434-713 SEQ ID NO 2), що є зворотно комплементарною послідовності-мішені коатомера COPI ККЖ.

SEQ ID NO 2:

```
GGGTACCTGTGGCTCTCACAGGCAGCGAAGATGGTACCGTTAGAGTTTGGCATACGAATACACACAGATTAGAGAAT
TGTTTGAATTATGGGTTTCGAGAGAGTGTGGACCATTTGTTGCTTGAAGGGTTCAATAATGTTTCTCTGGGGTATGA
CGAGGGCAGTATATTAGTGAAAGTTGGAAGAGAAGAACCGGCAGTTAGTATGGATGCCAGTGGCGGTAAAATAATTT
GGGCAAGGCACCTCGGAATTACAACAAGCTAATTTGAAGGCGCTGCCAGAAGGaagtactcgatcgatcgatcgatcgatc
tatcacgataccttctaccacatatcactaacaacatcaacactcatcactctcgacgacatccactcgatcactac
tctcacagcaccgattaactcctcatccacgcgccgctgcaggagcCCTTCTGGCAGCGCCTTCAAATTAGCTTG
TTGTAATTCCGAGTGCCTTGCCCAAATTATTTTACCGCCACTGGCATCCATACTAAGTCCGGTCTCTCTCTTCCAA
CTTTCACTAATATACTGCCCTCGTCATACCCAGAGAAACATTATTCGAACCCTTCAAGCAACAAATGGTCCACACT
CTCTCGAACCATAATTCAAACAATCTCTAATCTGTGTATTCGTATGCCAAACTCTAACGGTACCATCTTCGCT
GCCTGTGAGAGCCACAGGTA
```

10

- Конструювали два плазмідних вектори для продукування длРНК ККЖ з використанням клонуючого вектора pUC19, що містив ген стійкості до ампіциліну, N-термінальний фрагмент гена lac Z E. coli, сайт множинного клонування та точку початку реплікації. Вектор ККЖ-hp конструювали таким чином, що промотор T7 був функціонально зв'язаний з длРНК-кодуючою ділянкою SEQ ID NO 2. Див. Фіг. 2A, на якій проілюстровано схематичну карту вектора pCPB-hp. Для запобігання або мінімізації зчитування не-длРНК-кодуючих ділянок РНК-полімеразою T7 та продукування непотрібної олРНК з плазмідного скелета сконструювали вектор pCPB-hp+2T розміщенням двох термінаторних послідовностей T7 (РТН-термінатор та термінатор рЕТ-T7) на 3'-кінці длРНК-кодуючої ділянки. Див. Фіг. 2B та 2C, на яких проілюстровано схематичні карти вектора pCPB-hp+2T.

- Штам HT115 (DE3) E. coli strain придбали у Центрі генетики Caenorhabditis, Університет штату Мінесота (генотип HT115 (DE3) такий: F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14:Tn10(лізоген DE3: промотор lavUV5 - полімераза T7) (РНКаза III мінус)). Клітини HT115 (DE3) E. coli трансформували pUC19 (контроль), pCPB-hp або pCPB-hp+2T та вирощували протягом ночі при 37°C або 25°C. Загальну РНК виділяли з 20 мкл культури та або аналізували безпосередньо на агарозному гелі (Фіг. 3A, позначені доріжки: 1 (pUC19), 2 (pCPB-hp) та 3 (pCPB-hp+2T)), або обробляли РНКазою перед проведенням аналізу на агарозному гелі (Фіг. 3B, позначені доріжки: 1 (pUC19), 2 (pCPB-hp) та 3 (pCPB-hp+2T)).

- Клітини HT115 (DE3) E. coli також трансформували двома плазмідами, одна несла длРНК-матрицю (pUC19 (контроль), pCPB-hp або pCPB-hp+2T), а інша несла РНК-полімеразу T7 під контролем індукцйбельного елемента (IPTG-індукцйбельна полімераза T7). Трансформовані клітини вирощували протягом ночі при 37°C або 25°C. Загальну РНК виділяли з 20 мкл культури та або аналізували безпосередньо на агарозному гелі (Фіг. 3A, позначені доріжки: 4 (pUC19 і pLac-T7), 5 (pCPB-hp і pLac-T7) та 6 (pCPB-hp+2T і pLac-T7)), або обробляли РНКазою перед проведенням аналізу на агарозному гелі (Фіг. 3B, позначені доріжки: 4 (pUC19 і pLac-T7), 5 (pCPB-hp і pLac-T7) та 6 (pCPB-hp+2T і pLac-T7)).

Як проілюстровано на Фіг. 3А та Фіг. 3В, трансформовані клітини, вирощені при 37°C, продукували більше РНК, ніж клітини, вирощені при 25°C, вихід длРНК покращували експресією полімерази Т7 в клітинах-хазяях та включенням двох термінаторних послідовностей на 3'-кінці до матриці длРНК, що призводило до подальшого збільшення виходу длРНК. Вихід длРНК 30-50 мг/л спостерігали для клітин *E. coli*, що експресували РНК-полімеразу Т7 та длРНК-конструкцію рCPB-hr+2T. (Дані не показані).

Приклад 2

Продукція длРНК колорадського картопляного жука (ККЖ)

1. Трансформація

Плазмідами рCPB-hr+2T та рLac-T7 трансформували штам HT115 (DE3) *E. coli*, як описано в прикладі 1. Після трансформації висаджували клітини *E. coli* та відбирали одиничні колонії.

2. Умови культивування

Одиночні колонії вирощували 6-8 годин при 37°C у 3 мл середовища ЛБ, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 12,5 мкг/мл тетрацикліну для отримання посівної культури. Для індукування експресії длРНК, в колбі на 250 мл інокулювали 200 мкл посівної культури у 50 мл середовища для аутоіндукції (AIM) (Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207–234), що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 12,5 мкг/мл тетрацикліну, а потім проводили інкубування. Клітини збирали центрифугуванням при 6000 g протягом 10 хв при 4°C.

3. Очищення РНК

Бактеріальну РНК очищували, використовуючи спосіб, заснований на протоколі Стеда SNAP (Stead et al, Nucleic Acids Res. 2012 Nov 1; 40(20):e156.) з модифікацією буферного розчину для екстракції РНК, як описано нижче. Один мілілітр бактеріальної культури (~10⁸ клітин) центрифугували при 16000g протягом 30 с, а супернатант видаляли. Осад клітин зберігали на сухому льоді до початку екстракції. Потім осади клітин ресуспендували у 100 мкл модифікованого розчину для екстракції РНК [18 мМ ЕДТА, 0,025 % ДСН, 5 мМ ТСЕР, 95 % формаміду (ступінь чистоти для аналізу РНК)] при сильному перемішуванні на вортексі. Розчин 1 % 2-меркаптоетанолу, який використовувався у розчині для екстракції РНК за протоколом Стеда SNAP, замінили 5 мМ розчином ТСЕР, тому що ТСЕР має набагато меншу токсичність у порівнянні з 2-меркаптоетанолом та однакову з 2-меркаптоетанолом ефективність (дані не показані).

Після ресуспендування у модифікованому розчині для екстракції РНК, клітини лізували інкубуванням зразка при 95°C на водяній бані протягом 7 хв. Дебріс клітин осаджували центрифугуванням теплового зразка при 16000 g протягом 5 хв при кімнатній температурі. Супернатант обережно переносили у чисту пробірку не порушуючи осад.

Загальну РНК, виділену з неіндукованих (Фіг. 4, доріжка 1) та індукованих (Фіг. 4, доріжка 2) рCPB-hr+2T клітин *E. coli*, розбавляли H₂O та аналізували на агарозному гелі. Як проілюстровано на Фіг. 4, спостерігали полосу, яка відповідає длРНК ККЖ, у індукованих клітинах рCPB-hr+2T *E. coli*, але неіндукованих клітинах рCPB-hr+2T *E. coli*.

Приклад 3

Порівняння РНК, транскрибованої *in vivo* та *in vitro*

Плазмиду рCPB-hr+2T лінеаризували та використовували як матрицю для транскрипції РНК *in vitro*. Для визначення розміру РНК-транскриптів транскрибовану *in vitro* РНК (Фіг. 5А, доріжки 9 та 10) аналізували на агарозному гелі разом з транскрибованою в бактеріях РНК, очищеною згідно з модифікованим протоколом SNAP, описаним у прикладі 1, та безпосередньо розбавленою у H₂O (Фіг. 5А, доріжки 5 та 6) або відфільтрованою на мембрані з відсіканням молекулярної маси 30K (Amicon) для видалення реактивів, таких як ЕДТА, ДСН, ТСЕР та формаміду, перед розбавленням H₂O (Фіг. 5А, доріжки 5 та 6). Виявилось, що транскрибована *in vitro* РНК більша, ніж транскрибована у бактеріях РНК (див. Фіг. 5А).

Транскрибовані *in vitro* та *in vivo* (в бактеріях) РНК інкубували з РНКазою А, що розщеплює одноланцюгові, але не дволанцюгові РНК. Як проілюстровано на Фіг. 5В, після розщеплення РНКазою А, розміри продуктів транскрипції РНК були однакові *in vivo* (доріжки 5-8) та *in vitro* (доріжки 9 та 10). Цей факт вказує на те, що збільшений розмір транскрибованої *in vitro* РНК утворився завдяки наявності одноланцюгової шпилькової петлі, яка видалялася у бактеріальній клітині процесингом РНК.

Приклад 4

Забезпечення загибелі *E. coli* нагріванням

Експериментально визначали температурний діапазон для забезпечення загибелі клітин HT115 (DE3) *E. coli* нагріванням без лізису клітин. Клітини HT115 (DE3) *E. coli* інкубували при різній температурі від 37°C до 72°C протягом 30 хв. Потім оброблені нагріванням клітини досліджували під мікроскопом для визначення того, чи відбувся лізис, висаджували на чашки з

ЛБ та інкубували протягом ночі для визначення здатності до виживання після теплової обробки. Як показано у табл. 1, нагрів до температур 59°C та вище вбивав усі клітини, проте лізис клітин не спостерігали для будь-якої з досліджених температур аж до 72°C (див. Фіг. 6).

Таблиця 1

Лізис та здатність до виживання клітин після теплової обробки

	37°C	51°C	54°C	59°C	62°C	67°C	69°C
Низька ОГ, лізис клітин (мікроскоп)	–	–	–	–	–	–	–
Низька ОГ, виживання клітин (чашка з ЛБ)	+	+	–	–	–	–	–
Висока ОГ, лізис клітин (мікроскоп)	–	–	–	–	–	–	–
Висока ОГ, виживання клітин (чашка з ЛБ)	+	+	< 10 %	–	–	–	–

5

Усі клітини обробляли протягом 30 хвилин при різній температурі. Низька ОГ – це ОГ₆₀₀”0,2 та висока ОГ – це ОГ₆₀₀”2.

Приклад 5

Оптимізація виходу бактеріальної дЛРНК — Середовище для вирощування

10 Для визначення того чи може бути покращений вихід продукування бактеріальної РНК вибором середовища випробовували три багатих середовища, середовище для аутоіндукції (AIM) (Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207–234), середовище Super Broth (Atlas, R. M. Handbook of microbiological media. 1997. CRC Press, New York, USA) + середовище та середовище Plasmid+AIM.

15 Середовище для аутоіндукції (AIM) містить: 1 % N-Z-аміну AS, 0,5 % дріжджового екстракту, 0,5 % гліцерину, 0,05 % глюкози, 0,2 % альфа-лактози, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ KH₂PO₄, 20 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgSO₄.

20 Середовище Super Broth+AIM містить: 3,2 % триптон, 2 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 1 % гліцерину, 0,1 % глюкози, 0,4 % альфа-лактози, 50 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ KH₂PO₄, 40 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ MgSO₄.

Середовище Plasmid+AIM містить: Середовище Plasmid+ (Thomson Instrument Co.), 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ KH₂PO₄, 20 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgSO₄, 0,5 % гліцерину, 0,05 % глюкози, 0,2 % альфа-лактози для аутоіндукції.

25 Посівні культури DV49 HT115 (DE3) E. coli готували згідно з умовами культивування, описаними у прикладі 2. Ідентичними кількостями посівної культури інокулювали 3 різних середовища для продукування та інкубували їх згідно з умовами, описаними у прикладі 2. Через 16 годин культивування на колбах клітини збирали для випробування на визначення виходу.

30 Клітини DV49, вирощені на AIM, дали вихід 40 мг/л РНК. Клітини DV49, вирощені на середовищі Super Broth+, дали вихід 207 мг/л РНК. Клітини DV49, вирощені на середовищі Plasmid+AIM, дали вихід 96 мг/л РНК. На основі даних виходу бактеріальної РНК DV49 на 3 середовищах, Super Broth+ дало найвищий вихід цільового продукту. Див. Фіг. 7А.

Вплив середовища Super Broth+ на продукцію дЛРНК ККЖ досліджували як описано вище. Клітини рCPB-hp+2THT115 (DE3) E. coli, які культивували у середовищі Super Broth+, дали вихід 66 мг/л РНК. Див. Фіг. 7В. У порівнянні з іншими випробуваними середовищами вихід на середовищі Super Broth+ є вдосконаленням.

35 Приклад 6

Біоефективність дЛРНК щодо колорадського картопляного жука

40 Отримували три зразки дЛРНК, нелізовані вбиті нагріванням рCPB-hp+2T HT115 (DE3) E. coli, очищені транскрибовані в бактеріях дЛРНК ККЖ та транскрибовані in vitro дЛРНК ККЖ, як описано вище, для випробування на біоефективність препаратів дЛРНК проти колорадського картопляного жука (ККЖ), *Leptinotarsa decemlineata*.

Проводили біологічні аналізи на личинках ККЖ, використовуючи штучне харчування з 13,2 г/л агару (Serva 11393), 140,3 г/л преміксу Bio-Serve (F9380B), 5 мл/л КОН (18,3 % мас./мас.) та 1,25 мл/л формаліну (37 %). Субстрат харчування розподілили в аліквотах по 200 мкл у 96-лункових планшетах та недовго висушували перед внесенням зразків. Аліквоти по

45

двадцять (20) мкл випробуваного зразка (нелізовані вбиті нагріванням рСРВ-hp+2Т НТ115 (DE3) *E. coli*, очищені транскрибовані в бактеріях длРНК ККЖ або транскрибовані *in vitro* длРНК ККЖ) вносили у кожну лунку зі стерильною водою, що слугувала як необроблений контроль (НОК). Планшетам давали змогу висохнути перед додаванням личинок. За допомогою пензля з тонким ворсом в кожну лунку додавали по одній новонародженій личинці ККЖ. Потім планшети закривалися плівкою майлар та створювали вентиляцію, використовуючи ентомологічну булавку. На одну обробку у випробуванні використовували тридцять дві (32) личинки.

Планшети для біологічних аналізів інкубували при 27° С, відносній вологості (RH) 60 %, у повній темноті протягом 10 – 12 днів. Потім планшети оцінювали на ступінь загибелі (табл. 2) та затримки росту личинок (табл. 3). Дані аналізували з використанням статистичного програмного забезпечення JMP®4 (SAS Institute, 1995) та проводили повнофакторний аналіз дисперсії ANOVA з критерієм Данета для виявлення впливу обробок у порівнянні з необробленим контролем ($P < 0,05$). Для порівняння всіх пар обробок ($P < 0,05$) проводили випробування з апостеріорним критерієм Тьюкі-Крамера.

Як показано у табл. 2 та 3, усі препарати длРНК ККЖ показали статистично значиму активність проти колорадського картопляного жука. Наприклад, 87,5 % значень розмірів жуків інгібувалися найнижчою випробуваною концентрацією нелізованих вбитих нагріванням *E. coli* (0,00002 мг/мл).

Таблиця 2

Біологічний аналіз смертності від длРНК ККЖ

Умови обробки	длРНК Конц. (мг/мл)	Середнє	Станд. відх.	СПСЗ	$P > t $ (Нег.)	Т-групування	Контамінація
<i>E. coli</i> Тmt нагріву {60 С; 30 хв}	0,00002	87,50	10,21	5,10	***	A	0
<i>E. coli</i> Тmt нагріву {60 С; 30 хв}	0,0001	100,00	0,00	0,00	***	A	0
<i>E. coli</i> Тmt нагріву {60 С; 30 хв}	0,0005	100,00	0,00	0,00	***	A	0
Бактеріальна длРНК	0,00002	62,50	10,21	5,10	***	B	0
Бактеріальна длРНК	0,0001	93,75	12,50	6,25	***	A	0
Бактеріальна длРНК	0,0005	100,00	0,00	0,00	***	A	0
Транскрибована <i>in vitro</i> длРНК	0,00002	43,75	21,65	10,83	***	C	0
Транскрибована <i>in vitro</i> длРНК	0,0001	93,30	7,77	3,88	***	A	0
Транскрибована <i>in vitro</i> длРНК	0,0005	96,88	6,25	3,13	***	A	0
dH2O	0	6,25	7,22	3,61		D	0
Неіндукована <i>E. coli</i> , Тmt нагріву {60 С; 30 хв}	0	9,38	18,75	9,38		D	0

Таблиця 3

Біологічний аналіз длРНК ККЖ щодо затримки росту

Умови обробки	Конц. (мг/мл)	Середнє	Станд. відх.	СПСЗ	P> t (Нег.)	Т-групування	Контамінація
E. coli Tmt нагріву {60 C; 30 хв}	0,00002	2,33	1,15	0,67	***	AB	0
E. coli Tmt нагріву {60 C; 30 хв}	0,0001	.					0
E. coli Tmt нагріву {60 C; 30 хв}	0,0005	.					0
Бактеріальна длРНК	0,00002	0,25	0,50	0,25		D	0
Бактеріальна длРНК	0,0001	1,00				CD	0
Бактеріальна длРНК	0,0005	.					0
Транскрибована in vitro длРНК	0,00002	1,75	0,50	0,25	***	BC	0
Транскрибована in vitro длРНК	0,0001	3,00	0,00	0,00	***	A	0
Транскрибована in vitro длРНК	0,0005	2,00			***	ABC	0
dH2O	0	0,00	0,00	0,00		D	0
Неіндукована E. coli Tmt нагріву {60 C; 30 хв}	0	0,00	0,00	0,00		D	0

Приклад 7

Біоефективність длРНК DV49

- 5 Конструювали плазмиду зі скелетом рUC та промотором T7, що керує експресією антисмислової DV49+петля+сислової DV49+PTH-термінатор+термінатор рЕТ-T7. Див. Фіг. 8. Нуклеотидна послідовність експресійної конструкції DV49 представлена як SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO 4:

TAATACGACTCACTATAGGGATCCATGATATCGTGAACATCATCTACATTCAAATTC
TTATGAGCTTTCTTAAGGGCATCTGCAGCATTTTTCATAGAATCTAATACAGCAGTA
TTTGTGCTAGCTCCTTCGAGGGCTTCCCTCTGCATTTCATAGTTGTAAGGGTTCCAT
CTATTTGTAGTTGGGTCTTTTCCAATCGTTTCTTCTTTTGAGGGCTTGGAGTGCAAC
TCTTTTATTTTTCGACGCATTTTCTTTGCaagtactcgcgatcgcgttaacgctttatcacgataccttctaccacat
atcactaacaacatcaacactcatcactctcgacgacatccactcgatcactactctcacagaccgattaactcctcatccacgcggcgcc
tgcaggagcGCAAAGAAAAATGCGTCGAAAAATAAAAGAGTTGCACTCCAAGCCCTCAA
AAAGAAGAAACGATTGGAAAAGACCCAACTACAAATAGATGGAACCCCTTACAACATA
TTGAAATGCAGAGGGAAGCCCTCGAAGGAGCTAGCACAAATACTGCTGTATTAGAT
TCTATGAAAAATGCTGCAGATGCCCTTAAGAAAGCTCATAAGAATTTGAATGTAGAT
GATGTTACGATATCATGGATAagcttgccatctgttttctgcaagatcagctgagcaataactagcataaccccttg
ggcctctaaacgggtcttgaggggttttctgctgaaaggaggaaactatatccgga

- 10
- 15 Нуклеотиди 1-17 кодують промотор T7; нуклеотиди 21-260 кодують анти-смилову послідовність, яка практично комплементарна нуклеотидній послідовності-мішені гена злакового кореневого черв'яка (*Diabrotica virgifera*); нуклеотиди 261-410 кодують петле-утворюючу ділянку; нуклеотиди 411-650 кодують смислову послідовність, яка практично ідентична нуклеотидній послідовності-мішені гена злакового кореневого черв'яка (*Diabrotica virgifera*); нуклеотиди 659-668 кодують PTH-термінатор; нуклеотиди 681-764 кодують термінатор рЕТ-T7.

Клітини HT115 (DE3) *E. coli* трансформували двома плазмідами, одна несла длРНК-експресійну конструкцію DV49, а інша несла РНК-полімеразу T7 під контролем індукцибельного елемента (IPTG-індуцибельна полімераза T7). Клітини вирощували до потрібної щільності клітин та визначали вихід длРНК. Клітини DV49, що експресували длРНК, нагрівали до температури щонайменше 59 °C протягом 30 хвилин для забезпечення загибелі клітин. Клітини DV49, що експресували длРНК, титрували таким чином, що у композиціях зростали концентрації длРНК, наприклад, 0,00002, 0,001 та 0,005 мг/мл, та композиції, що містили вбиті нагріванням клітини DV49, що експресували длРНК, або вбиті нагріванням контрольні клітини HT115 (DE3) *E. coli* вводили до харчування личинок злакового кореневого черв'яка. Оцінювали ступінь смертності та ускладнень личинок і визначали масу личинок, що вижили. Ступені загибелі, затримки росту та інших видів пригнічення личинок злакового кореневого черв'яка після поглинання вбитих нагріванням клітин DV49, що експресували длРНК, при порівнянні з контрольними клітинами показують, що поглинання вбитих нагріванням клітин DV49, що експресували длРНК, є ефективним для контролю зараження злаковим кореневим черв'яком.

Приклад 8

Біоефективність лізованих та нелізованих бактерій

Готували культури HT115 (DE3) *E. coli* pCPB-hr+2T та отримані клітини вбивали нагріванням, як описано у прикладі 4. Потім аліквоту вбитих нагріванням клітин HT115 (DE3) *E. coli* pCPB-hr+2T лізували хімічними, ферментативними, механічними засобами або заморожуванням-відтаюванням для утворення лізату клітин. Потім аліквоту лізату клітин частково очищували центрифугуванням для видалення дебрису клітин. Потім три зразка, нелізовані вбиті нагріванням клітини HT115 (DE3) *E. coli* pCPB-hr+2T, неочищений лізат клітин та частково очищений лізат клітин випробували на біоефективність проти колорадського картопляного жука (ККЖ), *Leptinotarsa decemlineata*, як описано вище у прикладі 6. Для аліквот трьох зразків додатково провели процедури отримання різних препаратів, такі як ліофілізація або заморожування, та дії температур, таких як кімнатна температура, 4°C та 0°C, для збільшення тривалості часу, та біоефективність зразків, яких піддали процедурам отримання різних препаратів та умов зберігання, визначали проведенням біологічних аналізів, як описано вище у прикладі 6. Порівняли біоефективність різних зразків препаратів та вибрали препарат, що показав високий ступінь біоефективності та стабільності.

Приклад 9

Оптимізація виходу длРНК — кількість та комбінація термінаторів

Конструювали плазмідний вектор для ефективного продукування длРНК вставкою у положення 3' до длРНК-кодуючої послідовності 2, 3, 4, 5 або 6 послідовностей транскрипційної термінації, кожна з яких, незалежно, вибрана з групи, що складається з: РТН-термінатора, термінатора рЕТ-T7, термінатора Т3-Тф, термінатора рBR322-P4, термінатора вірусу везикулярного стоматиту, термінатора glnB-TI, термінатора glnC, транскрипційного термінатора TTabc, таким чином, що послідовності транскрипційних термінаторів утворюють функціональну комбінацію з промотором.

Клітини-хазяї трансформували сконструйованими векторами та індукували транскрипцію длРНК-кодуючої послідовності за промотором. Визначали ефективність термінації для кожної кількості та комбінації транскрипційних послідовностей термінаторів. Мінімальну кількість та комбінацію послідовностей термінаторів, які показали найвищу ефективність термінації, вибрали як конструкцію з високою ефективністю термінації, що мінімізує непродуктивне зчитування завдяки векторній послідовності та покращує вихід длРНК у порівнянні з конструкцією з низькою ефективністю термінації.

Приклад 10

Оптимізація виходу длРНК — розмір плазміди

Конструювали плазмідний вектор для ефективного продукування длРНК вставкою сконструйованої длРНК-експресійної конструкції, яка містить промотор, длРНК-кодуючий елемент та дві чи більше послідовностей термінаторів, до мінімального плазмідного вектора, що не містить маркер, який вибирається на основі білків, та/або несуттєві спейсерні послідовності. Якщо очікуваний розмір вектора, що містить сконструйовану длРНК-експресійну конструкцію, ставав меншим мінімального розміру для ефективної реплікації плазміди, у вектор вставляли одну або більше додаткових сконструйованих длРНК-експресійних конструкцій або длРНК-кодуючих елементів для досягнення мінімального розміру для ефективної реплікації результуючого вектора експресії. Клітини-хазяї трансформували длРНК-експресійним вектором. Якщо потрібно, котрансформують вектор, що кодує РНК-полімеразу, яка керує транскрипцією длРНК, длРНК-експресійним вектором. Мінімальний векторний скелет забезпечив отримання зменшеної матриці для непродуктивного зчитування не-длРНК-кодуючої послідовності, що

покращує вихід длРНК у порівнянні з плазмідною з більшим відсотковим вмістом векторного скелета.

Приклад 11

Оптимізація виходу длРНК — лінеаризована матриця

Конструювали плазмідний вектор для ефективного продукування длРНК вставкою сайту рестрикції ендонуклеази, що не розрізає геном клітини-хазяїна (наприклад, I-Sce1, яка не має будь-яких сайтів в геномі *E. coli*, сайту рестрикції ZFN або сайту рестрикції TALEN) у положенні, яка знаходиться на 3'-кінці до длРНК-кодуючої послідовності, що функціонально зв'язана з промотором. Див., наприклад, Фіг. 9. Клітини-хазяї котрансформували вектором продукування длРНК + ендонуклеази та вектором, що кодує ендонуклеазу, яка розпізнає сайт рестрикції. В деяких випадках експресія ендонуклеази була індукційною, а ендонуклеаза могла кодуватися на векторі, який додатково кодував РНК-полімеразу, що керувала продукцією длРНК. Експресія ендонуклеази лінеаризувала вектор продукування длРНК, тим самим видаляючи непродуктивне зчитування векторної послідовності та покращуючи вихід длРНК у порівнянні з нелінеаризованою плазмідною.

Приклад 12

Оптимізація виходу длРНК — Порівняння комбінацій термінаторів

Порівняння виходу продукування РНК проводили з різними термінаторами, клонованими на однаковій експресійній плазміді.

1. Розробка вектора для продукування РНК.

Конструювали дев'ять плазмідних векторів, які мали різні термінатори або комбінації термінаторів, з використанням клонуючого вектора pUC19, що містить ген стійкості до ампіциліну, N-термінальний фрагмент гена *lac Z* *E. coli*, сайт множинного клонування та точку початку реплікації. Термінаторні послідовності, показані нижче у табл. 4, клонували у вектор pUC19 у прямому напрямку зчитування промотора T7 для продукування 9 різних векторів, що мали різні термінатори або комбінації термінаторів. Послідовність ДНК (SEQ ID NO 2), яка кодувала CPB-hr, вставляли у вектор у прямому напрямку зчитування промотора T7 та у зворотному напрямку зчитування термінаторної послідовності.

Таблиця 4

Послідовності термінаторів, використані у векторах для продукування РНК.

SEQ ID NO.	Термінатор	Послідовність
5	PET	CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG
6	PTH1	CATCTGTTT
7	PTH2	CTCATGCTTGCCATCTGTTTTCTTGCAAGTCAGATGGGA
8	rrn BT1	GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTT ATCTGTTGTTTGTCG
9	rrn BT2	TTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTAC
10	CJ	CTGTGTCCCTATCTGTTACAGTCTCCTAAAGTAT
11	B1002	CCCCGCTTCGGCGGGTTTTTT
12	B1006	CCCCGCCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTTTT
13	PTH+PET	CATCTGTTTTCTTGCAAGATCAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTG GGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACCTAT ATCCGGA

2. Умови культивування.

Плазмідними векторами трансформували клітини HT115 (DE3) *E. coli*. Для кожного плазмідного вектора відбирали одиночні колонії та вирощували 6-8 годин при 37°C у 3 мл середовища ЛБ, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 12,5 мкг/мл тетрацикліну для отримання посівної культури. Для індукування експресії длРНК, в колбі на 250 мл інокулювали 200 мкл посівної культури у 50 мл середовища для аутоіндукції (AIM) (Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207–234), що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 12,5 мкг/мл тетрацикліну, а потім проводили інкубування. Клітини збирали центрифугуванням при 6000 g протягом 10 хв при 4 °C.

3. Очищення та вимірювання кількості РНК.

Загальну РНК очищували з бактеріальних клітин згідно з протоколом, описаним у прикладі 2, та аналізували на агарозному гелі для вимірювання кількості продукрованої РНК. Як

проілюстровано на Фіг. 10, високі рівні продукування РНК спостерігали для векторів для продукування РНК, що містили у тандемі 2 термінатори (РТН та РЕТ). Більшість векторів для продукування РНК, що містили одиночні термінатори, не продукували визначаємі рівні РНК. Не бажаючи бути зв'язаними з конкретною теорією, автори передбачають, що неефективність

5 одиночного термінатора щодо зупинки транскрипції Т7 може призводити до слабкого продукування РНК. Вектори для продукування РНК, які містили одиночні термінатори РЕТ або *rrn* BT2, продукували визначаємі кількості РНК, проте виходи для векторів для продукування з РЕТ та *rrn* BT2 були відносно низькими, порівнюючи з вектором для продукування РНК, який містив 2 термінатори (відповідно, 16 % та 40 %). Див. Фіг. 10.

10 4. Структурне порівняння.

Вторинні структури, утворені термінаторами, аналізували з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). Визначали також вільну енергію вторинних структур. Див. табл. 5. Як проілюстровано на Фіг. 11, термінатори, що забезпечували найвищі виходи продукування РНК (РЕТ, *rrn* BT2 та РТН;РЕТ), мали подібні вторинні структури, які представляли шпилькову

15 структуру зі стеблом з близько від 10 до 20 пар основ. Термінатори, асоційовані з малою або не виявляємою продукцією РНК на векторах для продукування РНК, мали шпильки, що були або надто короткими або дуже довгими для зупинки транскрипції. Виявили, що конструкція з 2 термінаторами РТН;РЕТ, що дала найбільший вихід у порівнянні з іншими конструкціями з одиночним термінатором, мала сусідні шпильки малого або середнього розміру. Див. Фіг. 11.

Таблиця 5

Вільна енергія вторинних структур

Термінатор	Вільна енергія вторинних структур
РЕТ	$\Delta G = -24,0$ ккал/моль
РТН	$\Delta G = -9,5$ ккал/моль
<i>rrn</i> BT1	$\Delta G = -39,3$ ккал/моль
<i>rrn</i> BT2	$\Delta G = -23,2$ ккал/моль
CJ	$\Delta G = -2,5$ ккал/моль
B1002	$\Delta G = -15,5$ ккал/моль
B1006	$\Delta G = -18,5$ ккал/моль
РТН+РЕТ	$\Delta G = -38,6$ ккал/моль

Приклад 13

Оцінка впливу вторинної структури на вихід РНК

Порівняння виходу продукування РНК проводили з шпилько-кодуючими послідовностями

25 різної довжини, клонованими на однаковому векторі для продукування РНК.

Послідовності ДНК, що кодували 27-мер (стебло з 27 п.н. плюс петля з 8 п.н.) (SEQ ID NO. 14), 240-мер (стебло з 240 п.н. з петлею з 150 п.н.) (SEQ ID NO. 15), 280-мер (стебло з 280 п.н. з петлею з 150 п.н.) (SEQ ID NO. 2) шпилькової РНК вставляли у зворотному напрямку зчитування термінатора РТН+РЕТ та у прямому напрямку зчитування промотора Т7 у вектор рUC19-РТН+РЕТ. Вторинні структури, утворені РНК-шпильками та термінаторами, визначали з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). Див. Фіг. 12. Як можна побачити на Фіг. 12А, 27-мерна РНК-шпилька виявляла вторинну структуру, подібну до тієї, що утворена термінатором РТН+РЕТ (кільцевий). 240-мерні та 280-мерні шпильки не виявили термінатор-подібну вторинну структуру. Див. Фіг. 12В та 12С.

Експресійними конструкціями 27-мерної РНК-шпильки/термінатора РТН+РЕТ, 240-мерної РНК-шпильки/термінатора РТН+РЕТ та 280-мерної РНК-шпильки/термінатора РТН+РЕТ трансформували клітини HT115 (DE3) *E. coli* та індукували продукцію РНК, як описано у прикладі 2. Як видно з Фіг. 13, вихід длРНК був помітно вище для конструкції 27-мерної РНК-шпильки/термінатора РТН+РЕТ, порівнюючи з конструкціями з довгими РНК-шпильками. Ці результати наводять на висновок, що присутність додаткових шпилькових структур середнього розміру в конструкції 27-мерної РНК-шпильки/термінатора РТН+РЕТ може допомагати термінації транскрипції Т7, що призводить до вищого виходу продукування РНК.

Приклад 14

Вплив кількості термінаторів та вторинної структури на вихід РНК

Порівняння виходу продукування РНК проводили з множиною різних термінаторів, клонованих на однаковому векторі для продукування РНК.

Як описано у прикладі 12, вище, покращену експресію РНК спостерігали на векторі для продукування РНК, що містив комбінацію з двома термінаторами РТН+РЕТ. Додаткові термінаторні послідовності клонували у векторі рUC19-РТН+РЕТ для визначення того, чи покращиться вихід РНК зі збільшенням кількостей термінаторних послідовностей. Оскільки спостерігали, що термінаторні послідовності РЕТ та *rrn* BT2 продукували найбільші виходи РНК у векторах для продукування РНК з одиночним термінатором, то ці послідовності вибирали для клонування у векторі рUC19-РТН+РЕТ. Зробили три додаткові вектори для продукування РНК: рUC19-*rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ; рUC19-РЕТ+*rrn* BT2+РТН+РЕТ та рUC19-*rrn* BT2+РТН+РЕТ. Плазміді мали підтверджені послідовності та ними трансформували клітини HT115 (DE3). Культивували клітини та виділяли загальну РНК, як описано у прикладі 12. Загальну РНК аналізували на агарозному гелі для вимірювання кількості продукованої РНК. Див. Фіг. 14.

Загальну РНК, продуковану на векторі рUC19-РТН+РЕТ (Фіг. 14, доріжка 1) використовували як базовий вихід РНК (100 %), а виходи загальної РНК з експресійних векторів рUC19-*rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ; рUC19-РЕТ+*rrn* BT2+РТН+РЕТ та рUC19-*rrn* BT2+РТН+РЕТ порівнювали з базовим. Дивно, що збільшення виходу РНК жорстко не корелювало з кількістю термінаторів, так як експресійний вектор з 3 термінаторами рUC19-*rrn* BT2+РТН+РЕТ, продукував 52 %, а експресійний вектор з 4 термінаторами, рUC19-РЕТ+*rrn* BT2+РТН+РЕТ, продукував 40 % від загальної РНК, продукованої базовим з 2 термінаторами. Див. Фіг. 14 та табл. 6. Однак вихід загальної РНК для експресійного вектора з 4 термінаторами (рUC19-*rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ) був на 35 % більшим, ніж такий вихід для базового з 2 термінаторами. Див. Фіг. 14 та табл. 6.

Вторинні структури, утворені термінаторами, визначали з використанням програми CLC Main Workbench (версія 6.8.4). Див. Фіг. 15. Як видно з Фіг. 15А, базовий вектор рUC19-РТН+РЕТ для продукування РНК з 2 термінаторами має вторинну структуру з 2 сусідніми шпильками середнього розміру (циклічні). Експресійний вектор з 4 термінаторами (рUC19-*rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ), який продукував найвищий вихід РНК, виявляє вторинну структуру з 3 сусідніми шпильками середнього розміру. Див. Фіг. 15В. Як проілюстровано на Фіг. 15С та Фіг. 15D, вектори для продукування РНК з найнижчими виходами загальної РНК виявляють вторинні структури без сусідніх шпильок середнього розміру.

Таблиця 6

Множинні термінатори.

Кількість термінаторів	Термінатори	SEQ ID NO:	Відносний вихід РНК (Порівняно з експресійною конструкцією РТН+РЕТ)
2	РТН+РЕТ	16	Базовий (100 %)
4	РЕТ+ <i>rrn</i> BT2+РТН+РЕТ	17	40 %
4	<i>rrn</i> BT2+РЕТ+РТН+РЕТ	18	135 %
3	<i>rrn</i> BT2+РТН+РЕТ	19	52 %

Приклад 15

Сусідні термінатори *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ забезпечують збільшений вихід РНК

На додатковому гені проводили порівняння виходу продукування РНК для термінаторних конструкцій РТН+РЕТ та РЕТ+*rrn* BT+РТН+РЕТ.

Послідовність ДНК (SEQ ID NO. 20), що кодувала 397-мерну шпильку, отриману з колорадського картопляного жука, вставляли у зворотному напрямку зчитування термінаторів та у прямому напрямку зчитування промотора T7 у векторі рUC19-РТН+РЕТ та рUC19-*rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ. Плазміді мали підтверджені секвенуванням послідовності, та ними трансформували клітини HT115 (DE3). Культивували клітини та проводили виділення загальної РНК, як описано у прикладі 12. Через 18 годин культивування, штам з експресійним вектором, що містив термінатори РТН+РЕТ, досяг значення OG_{600} 5,78 та продукував вихід РНК 44 мг/л, тоді як штам з експресійним вектором, що містив термінатори *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ, досяг значення OG_{600} 5,55 та продукував вихід РНК 132 мг/л. Ці результати наводять на висновок, що присутність додаткових шпилькових структур середнього розміру в конструкції термінаторів *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ може допомагати термінації транскрипції T7, що призводить до вищого виходу продукування РНК.

Приклад 16

Сусідні термінатори *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ забезпечують збільшений вихід білка

Послідовність ДНК, що кодувала білок А (MW 21k), клонували у вектори з термінатором рUC19-PET, термінатором рUC19-rrn BT2, термінаторами рUC19-PTH+PET та термінаторами рUC19-rrn BT2+PET+PTH+PET. Плазміди мали підтверджені послідовності та ними трансформували клітини BL21(DE3). Вибирали клітини, що містили експресійні плазміди, та потім культивували їх у середовищі ЛБ з карбеніциліном. До кожної культури при досягненні нею OD_{600} 0,5 додавали 1 мМ IPTG. Після індукції 4 години вирощували клітини. З клітин виділяли загальний білок кип'ятінням клітин протягом 5 хвилин у 2X буфері для внесення у ДСН-ПААГ. По 5 мкл кожного зразка вносили на гель ДСН-ПААГ. Як проілюстровано на Фіг. 16, клітини, які містили експресійні плазміди рUC19-PTH+PET та рUC19-rrn BT2+PET+PTH+PET, продукували найвищі виходи цільового білка.

Приклад 17

Розробка синтетичних термінаторів для збільшеної експресії РНК та білка

Послідовність термінатору rrn BT2+PET+PTH+PET (SEQ ID NO. 18) модифікували для видалення нешпилько-утворюючої послідовності та невідповідностей спарювання основ всередині шпилько-утворюючих ділянок. Програмою CLC Main Workbench (версія 6.8.4) було передбачено, що результуюча синтетична послідовність, SEQ ID NO. 21, утворює вторинну структуру з 3 сусідніми шпильками середнього розміру, що не мали невідповідностей спарювання у шпилько-утворюючих ділянках. Див. Фіг. 17В. Синтезували ДНК-полінуклеотид, що містив SEQ ID NO. 21. ДНК-полінуклеотид, що містив SEQ ID NO. 21, клонували у вектор рUC19 у прямому напрямку зчитування промотора T7.

В E. coli ідентифікували чотири різні передбачувані термінаторні послідовності та упорядкували їх у тандем, що призвело до отримання синтетичної послідовності, SEQ ID NO. 22. Програмою CLC Main Workbench (версія 6.8.4) передбачено, що SEQ ID NO. 22 утворює вторинну структуру з 4 сусідніми шпильками середнього розміру з кількома невідповідностями спарювання ("пухирцями") всередині шпилько-утворюючих ділянок. Див. Фіг. 17С. ДНК-полінуклеотид, що містив SEQ ID NO. 22, синтезували та клонували у вектор рUC19 у прямому напрямку зчитування промотора T7.

Модифікували SEQ ID NO. 22 для видалення нешпилько-утворюючої послідовності та невідповідностей спарювання основ всередині шпилько-утворюючих ділянок. Програмою CLC Main Workbench (версія 6.8.4) передбачено, що результуюча синтетична послідовність, SEQ ID NO. 23, утворює вторинну структуру з 4 сусідніми шпильками середнього розміру, яка не має невідповідностей спарювання у шпилько-утворюючих ділянках. Зробили спробу хімічно синтезувати ДНК-полінуклеотид, що містив SEQ ID NO. 23, однак продукт не отримали. Не бажаючи бути зв'язаними з конкретною теорією, автори передбачають, що вторинна структура SEQ ID NO. 23 могла впливати на синтез.

Таблиця 7

Синтетичні термінатори

SEQ ID NO.	Послідовність	Вільна енергія вторинних структур
18	AAGCTTGCTTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT TTGCGTTTTCTACCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG GTCTTGAGGGGTTTTTGGCCATCTGTTTTCTTGCAAGATCA GCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACG GGTCTTGAGGGGTTTTTGGTGAAGGAGGAACCTATATCCG GA	$\Delta G = -91,1$ ккал/моль
21	AAGCTTTAACCCCTCAGGACCCCTAAACGGGTCTTGAGGGG TTTCTCAGCTGATCTTGTTTTCTTGCAAGATCAGCTGAGCAAT AACTAGCACAACCCCTCAGGACCTCTAAACGGGTCTTGAGG GGTTGTGCTGAAAG	$\Delta G = -94,7$ ккал/моль
22	GGAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCTCTGTC GTTTCCCATACGCCACGGTACATAAAGTAACCGTGGCGTAA TGCCTGAAAAAACGGCCTGACGTGAATCAAGCAATTTTTTT CAGGGCGCACTAAAAGGGCATCTTTGATGCCCTTTTTGCAC GC	$\Delta G = -87,3$ ккал/моль

Таблиця 7 (продовження)

SEQ ID NO.	Послідовність	Вільна енергія вторинних структур
23	GGCACCGACAGGGGCCAGAAGCGAGCTTTCTGGCCTCTGT CGGTGCCCCGCCACGCCACGGTACATAAAGTACCGTGGCGT GGCGCCTGGCGCGCCGGCTTGACGTGAATCAAGCCGGCGC GCCAGGGCGCACTCGCGCGGGCATCATTTGATGCCCCGCGC GAGTGCACGC	$\Delta G = -157,7$ ккал/моль

Приклад 18

Оптимізація виходу РНК — Синтетичні термінатори

- 5 Клітини-хазяї трансформували сконструйованими векторами, що містили сконструйовану термінаторну послідовність, описану у SEQ ID NO. 21, 22 або 23, у функціональній комбінації з промотором, який функціонально зв'язаний з послідовністю, яка кодує цільову РНК. Індукували транскрипцію РНК-кодуючої послідовності за промотором. Визначали ефективність термінації кожної сконструйованої термінаторної послідовності. Вибирали сконструйовану послідовність термінатору, яка показала найвищу ефективність термінації. Вихід продукування РНК збільшувався з кількістю шпильок середнього розміру, утворених сконструйованою термінаторною послідовністю, так як сусідні шпильки середнього розміру сповільнювали або зупиняли транскрипцію, мінімізуючи непродуктивне зчитування векторної послідовності та покращуючи вихід РНК.

15 Приклад 19

- Конструювали плазмідні вектори для продукування РНК вставкою у положення 3' до РНК-кодуючої послідовності, послідовності термінатору РЕТ, РТН+РЕТ або *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ таким чином, що транскрипційна термінаторна послідовність утворювала функціональну комбінацію з промотором, який вибирали з групи, що складається з: T3, SV40, SP6, T5, промотора β -лактами, промотора галактози *E. coli*, промотора арабінози, промотора лужної фосфатази, промотора триптофану (*trp*), промотора лактозного оперону (*lac*), промотора *lacUV5*, промотора *trc* та промотора *tac*.

- 25 Клітини-хазяї трансформували сконструйованими векторами та індукували транскрипцію РНК-кодуючої послідовності за промотором. Визначали ефективність термінації для кожної кількості та комбінації транскрипційних послідовностей термінаторів. Вихід продукування РНК збільшувався у векторах з термінацією РТН+РЕТ, порівнюючи з векторами з термінацією РЕТ, та вихід продукування РНК збільшувався у векторах з термінацією *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ, порівнюючи з векторами з термінацією РТН+РЕТ (два термінатори) та РЕТ (єдиний термінатор), так як кількість шпильок середнього, утворених сконструйованою термінаторною послідовністю збільшувалася, оскільки термінатори РТН+РЕТ та *rrn* BT2+РЕТ+РТН+РЕТ мали сусідні шпильки середнього розміру, що сповільнювали або зупиняли транскрипцію, мінімізуючи непродуктивне зчитування векторної послідовності та покращуючи вихід РНК.

<110> Baum, James A.
Christian, Allen T
Evdokimov, Artem
Moshiri, Farhad
Weaver, Lisa M.
Zhang, Haitao

<120> КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ ПРОДУКУВАННЯ І ДОСТАВКИ РНК

<130> P34118WO00

<140> 61/793506

<141> 2013-03-15

<160> 23

<210> 1

<211> 379

<212> ДНК

<213> Leptinotarsa decemlineata

<400> 1

```
cgtaaccgcg gtttgtttcc accctgaact acctgtggct ctcacaggca gcgaagatgg 60
taccgttaga gtttggcata cgaatacaca cagattagag aattgtttga attatgggtt 120
cgagagagtg tggaccattt gttgcttgaa gggttcgaat aatgtttctc tggggtatga 180
cgaggggcagt atattagtga aagttggaag agaagaaccg gcagttagta tggatgccag 240
tggcggtaaa ataatttggg caaggcactc ggaattacaa caagctaatt tgaaggcgct 300
gccagaaggt ggagaaataa gagatgggga gcgtttacct gtctctgtaa aagatatggg 360
agcatgtgaa atataccct 379
```

<210> 2

<211> 713

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична

<400> 2

```
gggtacctgt ggctctcaca ggcagcgaag atgggtaccgt tagagtittg catacgaata 60
cacacagatt agagaattgt ttgaattatg ggttcgagag agtgtggacc atttggtgct 120
tgaaggggtc gaataatgtt tctctggggt atgacgaggg cagtatatta gtgaaagttg 180
gaagagaaga accggcagtt agtatggatg ccagtggcgg taaaataatt tgggcaaggc 240
actcggaatt acaacaagct aatttgaagg cgctgccaga aggaagtact gcgatcgcg 300
```

taacgcttta tcacgatacc ttctaccaca tatcactaac aacatcaaca ctcatcactc 360
 tcgacgacat ccaactcgatc actactctca cacgaccgat taactcctca tccacgcggc 420
 cgctgcagg agcccttctg gcagcgctt caaattagct tgttgtaatt ccgagtgcct 480
 tgcccaaatt attttaccgc cactggcacc cataactaact gccggttctt ctcttccaac 540
 ttctactaat atactgccct cgtcatatccc cagagaaaca ttattcgaac ccttcaagca 600
 acaaatggtc cacactctct cgaaccata attcaaaca ttctctaatt tgtgtgtatt 660
 cgtatgccaa actctaacgg taccatcttc gctgcctgtg agagccacag gta 713

<210> 3
 <211> 844
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 3

taatacgact cactataggg tacctgtggc tctcacaggc agcgaagatg gtaccgtag 60
 agtttggcat acgaatacac acagattaga gaattgtttg aattatgggt tcgagagagt 120
 gtggaccatt tgttgcttga agggttcgaa taatgtttct ctggggtagt acgagggcag 180
 tatattagtg aaagttggaa gagaagaacc ggcagttagt atggatgccg gtggcggtaa 240
 aataatttgg gcaaggcact cggaattaca acaagctaatt ttgaaggcgc tgccagaagg 300
 aagtactgcg atcgcgttaa cgctttatca cgataccttc taccacatat cactaacaac 360
 atcaacactc atcactctcg acgacatcca ctcgatcact actctcacac gaccgattaa 420
 ctctcatcc acgcggccgc ctgcaggagc ccttctggca gcgccttcaa attagcttgt 480
 tgtaattccg agtgccttgc ccaaattatt ttaccgccac tggcatccat actaactgcc 540
 ggttcttctc ttccaacttt cactaatata ctgccctcgt cataccccag agaaacatta 600
 ttgaaccct tcaagcaaca aatgggtccac actctctcga acccataatt caaacaattc 660
 tctaattctgt gtgtattcgt atgccaaact ctaacggtac catcttcgct gcctgtgaga 720
 gccacaggta aagcttgcca tctgttttct tgcaagatca gctgagcaat aactagcata 780
 accccttggg gcctctaaac gggctcttgag gggttttttg ctgaaaggag gaactatatc 840
 cgga 844

<210> 4
 <211> 764
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична

<400> 4

```

taatacgaact cactataggg atccatgata tcgtgaacat catctacatt caaattctta 60
tgagctttct taagggcacg tgcagcattt ttcatagaat ctaatacagc agtatttggtg 120
ctagctcctt cgagggcctt cctctgcatt tcaatagttg taagggttcc atctatttgt 180
agttgggtct tttccaatcg tttcttcttt ttgagggtt ggagtgaac tcttttattt 240
ttcgacgcat ttttctttgc aagtactgcg atcgcgtaa cgctttatca cgataccttc 300
taccacatat cactaacaac atcaaacctc atcactctcg acgacatcca ctcgatcact 360
actctcacac gaccgattaa ctctcatcc acgcggccgc ctgcaggagc gcaaagaaaa 420
atgcgtcgaa aaataaaaga gttgcactcc aagccctcaa aaagaagaaa cgattggaaa 480
agaccaact acaaatagat ggaaccctta caactattga aatgcagagg gaagccctcg 540
aaggagctag cacaaatact gctgtattag attctatgaa aaatgctgca gatgccctta 600
agaaagctca taagaatttg aatgtagatg atgttcacga tatcatggat aagcttgcca 660
tctgttttct tgcaagatca gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaaac 720
gggtcttgag ggggtttttg ctgaaaggag gaactatatc cgga 764

```

<210> 5

<211> 48

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична

<400> 5

```

ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttg 48

```

<210> 6

<211> 10

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична

<400> 6

```

catctgtttt 10

```

<210> 7

<211> 39

<212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична

 <400> 7

 ctcacgtcttg ccatctgttt tcttgcaagt cagatggga 39

 <210> 8
 <211> 65
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична

 <400> 8

 ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt 60
 tgatcg 65

 <210> 9
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична

 <400> 9

 ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt tctac 45

 <210> 10
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична

 <400> 10

 ctgtgtccct atctgttaca gtctcctaaa gtat 34

 <210> 11
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична

 <400> 11

ccccgcttcg gcgggggtttt tt 22

<210> 12
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 12

ccccgccctt gacagggcgg ggtttttttt t 31

<210> 13
 <211> 106
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 13

catctgtttt cttgcaagat cagctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa 60

acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccgga 106

<210> 14
 <211> 65
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 14

ggggtcatag caacatctgg cattttggtc tcttgagga acaaaatgcc agatgttgct 60

atgac 65

<210> 15
 <211> 633
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 15

gggatccatg atatcgtgaa catcatctac attcaaattc ttatgagctt tcttaagggc 60

atctgcagca tttttcatag aatctaatac agcagtattt gtgctagctc cttcgagggc 120

```

ttccctctgc atttcaatag ttgtaagggt tccatctatt ttagttggg tcttttccaa 180
tcgtttcttc tttttgaggg cttggagtg c aactctttta tttttcgacg catttttctt 240
tgcaagtact gcgatcgct taacgcttta tcacgatacc ttctaccaca tatcactaac 300
aacatcaaca ctcatcactc tcgacgacat ccaactcgatc actactctca cagcaccgat 360
taactcctca tccacgcggc cgctgcagg agcgcaaaga aaaatgcgtc gaaaaataaa 420
agagttgcac tccaagccct caaaaagaag aaacgattgg aaaagacca actacaaata 480
gatggaaccc ttacaactat tgaaatgcag agggaagccc tcgaaggagc tagcacaat 540
actgctgtat tagattctat gaaaaatgct gcagatgccc ttaagaaagc tcataagaat 600
ttgaatgtag atgatgttca cgatatcatg gat 633

```

```

<210>      16
<211>      106
<212>      ДНК
<213>      штучна послідовність

```

```

<220>
<223>      синтетична

```

```

<400>      16

```

```

catctgtttt cttgcaagat cagctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa 60
acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccgga 106

```

```

<210>      17
<211>      209
<212>      ДНК
<213>      штучна послідовність

```

```

<220>
<223>      синтетична

```

```

<400>      17

```

```

aagcttgcc ctcataaccc cttggggcct ctaaacgggt cttgaggggt tttttgttaa 60
gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt tgcgtttcta cgccatctgt tttcttgcaa 120
gatcagctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 180
ttttgctgaa aggaggaact atatccgga 209

```

```

<210>      18
<211>      209
<212>      ДНК
<213>      штучна послідовність

```

```

<220>
<223>      синтетична

```

<400> 18
aagcttgctt aagcagaagg ccatcctgac ggatggcctt tttgcgtttc tacctagcat 60
aacccttggt ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt ggccatctgt tttcttgcaa 120
gatcagctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 180
ttttgctgaa aggaggaact atatccgga 209

<210> 19
<211> 161
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична

<400> 19
aagcttgctt aagcagaagg ccatcctgac ggatggcctt tttgcgtttc tacgccatct 60
gttttcttgc aagatcagct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg 120
tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg a 161

<210> 20
<211> 944
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична

<400> 20
gatgatgtcg gactttccta atttgtcttc gatgatttga ttgctagtga ttggcaccct 60
ttggccgttc accttggcga aacctctctt ataaatcagt tctctgacag atttcaagtt 120
agggtatccc caagtgatgt aaggttcgca tattctgagc atgttgatgg tagctttgtt 180
gagcttgaca aagacaccat tgttgatattg aaggagccgg aacaattgga gaaccttgcg 240
tacttttagga gctactttgt tgataccctt tatacgaatt acgaatgcc aacttggttc 300
agcgggaacg taaaagtctc ctctggtttt agcttgctcg atcaacctaa cttcatctct 360
ttctttgagc cgggtattctt taacatactg ttcgccaag tactgcatc gcgttaacgc 420
tttatcacga taccttctac cacatatcac taacaacatc aacactcatc atctagactc 480
tcgacgacat ccactcgatc actactctca cagaccgat taactcctca tccacgcggc 540
cgcgagcggc cgaacagtat gttaaagaat accggctcaa agaaagagat gaagttaggt 600
tgatccgaca agctaaaacc agaggaaact ttacgttcc cgctgaagcc aagttggcat 660
tcgtaattcg tataaagggt atcaacaaag tagctcctaa agtacgcaag gttctccaat 720

tggtccggct ccttcaaata aacaatggtg tctttgtcaa gctcaacaaa gctaccatca 780
 acatgctcag aatatgcgaa ccttacatca cttggggata ccctaacttg aaatctgtca 840
 gagaactgat ttataagaga ggtttcgcca aggtgaacgg ccaaaggggtg ccaatcacta 900
 gcaatcaaat catcgaagac aaattaggaa agtccgacat catc 944

<210> 21
 <211> 139
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 21

aagctttaac ccctcaggac ccctaacgg gtcttgaggg gtttctcagc tgatcttggt 60
 ttcttgcaag atcagctgag caataactag cacaaccct caggacctct aaacgggtct 120
 tgaggggttg tgctgaaag 139

<210> 22
 <211> 169
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 22

ggaacgaca ggtgctgaaa gcgagctttt tggcctctgt cgtttcccat tacgccacgg 60
 tacataaagt aaccgtggcg taatgcctga aaaaaacggc ctgacgtgaa tcaagcaatt 120
 tttttcaggg cgactaaaaa gggcatcatt tgatgccctt ttgacacg 169

<210> 23
 <211> 170
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична

<400> 23

ggcaccgaca ggggscagaa gcgagctttc tggcctctgt cggtgcccg caccgccacgg 60
 tacataaagt accgtggcgt ggcgcctggc gcgccggctt gacgtgaatc aagccggcgc 120
 gccagggcgc actcgcgcgc gcacatcttg atgcccgcg gagtgacgc 170

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 5 1. Сконструйована експресійна конструкція, яка містить:
 а) промотор;

- b) першу послідовність нуклеїнової кислоти, транскрипційно розташовану у прямому напрямку зчитування промотора, причому перша послідовність нуклеїнової кислоти кодує длРНК або білок; та
- 5 c) другу послідовність нуклеїнової кислоти, розташовану 3'-кінцем до першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому друга послідовність нуклеїнової кислоти містить послідовність термінатора транскрипції *rrn* BT2, що включає SEQ ID NO: 9, послідовність першого термінатора транскрипції PET, що включає SEQ ID NO: 5, послідовність термінатора транскрипції PTH, що включає, SEQ ID NO: 6 або 7 і послідовність другого термінатора транскрипції PET, що включає SEQ ID NO: 5;
- 10 при цьому перша послідовність нуклеїнової кислоти та друга послідовність нуклеїнової кислоти функціонально зв'язані з промотором.
2. Сконструйована експресійна конструкція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що друга послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, що містить щонайменше 3 шпильки.
- 15 3. Сконструйована експресійна конструкція за будь-яким з пп. 1-2, яка **відрізняється** тим, що шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів.
4. Сконструйована експресійна конструкція за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що друга послідовність нуклеїнової кислоти вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 18 та 21.
- 20 5. Сконструйована експресійна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що промотор являє собою промотор бактеріофага.
6. Сконструйована експресійна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що промотор вибирають з групи, що складається з T7, T3, SV40, SP6, T5, промотора β -лактамази, промотора галактози *E. coli*, промотора арабінози, промотора лужної фосфатази, промотора триптофану (*trp*), промотора лактозного оперону (*lac*), промотора *lacUV5*, промотора *trc* та промотора *tac*.
- 25 7. Сконструйована експресійна конструкція за будь-яким з пп. 1-6, яка **відрізняється** тим, що перша послідовність нуклеїнової кислоти вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 та 20.
- 30 8. Спосіб покращення продукування РНК, який включає введення сконструйованої експресійної конструкції за будь-яким з пп. 1-4 у прокаріотичну клітину-хазяїна.
9. Спосіб покращення продукування РНК за п. 8, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн являє собою клітину HT115 (DE3) *E. coli*.
- 35 10. Спосіб покращення продукування білка, який включає введення сконструйованої експресійної конструкції за будь-яким з пп. 1-4 у прокаріотичну клітину-хазяїна.
11. Спосіб покращення продукування РНК за п. 10, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн являє собою клітину BL21(DE3).
12. Вектор, який містить сконструйовану експресійну конструкцію за будь-яким з пп. 1-7, яка **відрізняється** тим, що вектор являє собою плазмідний вектор.
- 40 13. Бактеріальна клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 12.
14. Бактеріальна клітина-хазяїн за п. 13, яка **відрізняється** тим, що бактеріальна клітина-хазяїн не експресує РНКазу А.
15. Бактеріальна клітина-хазяїн за п. 13 або п. 14, яка **відрізняється** тим, що бактеріальна клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*.
- 45 16. Система для культивування клітин для синтезу длРНК *in vivo*, яка включає бактеріальну клітину-хазяїна за будь-яким з пп. 13-15 та середовище для вирощування.
17. Система для культивування клітин за п. 15, яка **відрізняється** тим, що середовище для вирощування містить 3,2 % триптон, 2 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 1 % гліцерину, 0,1 % глюкози, 0,4 % альфа-лактози, 50 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ KH₂PO₄, 40 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ MgSO₄.
- 50 18. Композиція для контролю зараження безхребетними шкідниками, яка містить бактеріальну клітину-хазяїна за будь-яким з пп. 13-15, причому бактеріальна клітина є мертвою та нелізованою.
19. Композиція для контролю зараження безхребетними шкідниками, яка містить лізат бактеріальної клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 13-15.
- 55 20. Спосіб контролю зараження безхребетними шкідниками, який включає нанесення на рослину композиції за п. 18 або п. 19.
21. Композиція для пригнічення поширення вірусного захворювання у популяції рослин, яка містить бактеріальну клітину-хазяїна за будь-яким з пп. 16-18, причому бактеріальна клітина є мертвою та нелізованою.
- 60

22. Композиція для пригнічення поширення вірусного захворювання у популяції рослин, яка містить лізат бактеріальної клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 13-15.

23. Спосіб пригнічення поширення вірусного захворювання у популяції рослин, який включає застосування до рослини композиції за п. 21 або п. 22.

5 24. Транскрипційний термінатор, який містить послідовність нуклеїнової кислоти, що містить послідовність термінатора транскрипції *rrn* BT2, що включає SEQ ID NO: 9, послідовність першого термінатора транскрипції PET, що включає SEQ ID NO: 5, послідовність термінатора транскрипції PTH, що включає, SEQ ID NO: 6 або 7 і послідовність другого термінатора транскрипції PET, що включає SEQ ID NO: 5.

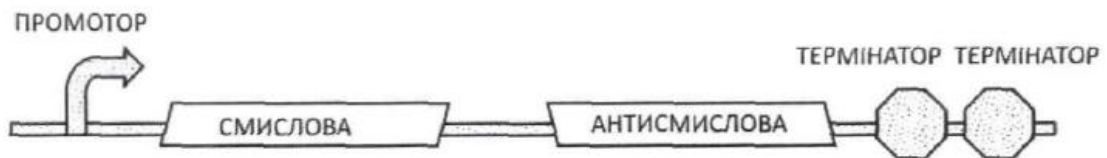
10 25. Транскрипційний термінатор за п. 24, який **відрізняється** тим, що послідовність нуклеїнової кислоти утворює вторинну структуру, яка містить щонайменше 3 шпильки.

26. Транскрипційний термінатор за п. 25, який **відрізняється** тим, що шпильки розділені спейсерною ділянкою, що містить 10 або менше нуклеотидів.

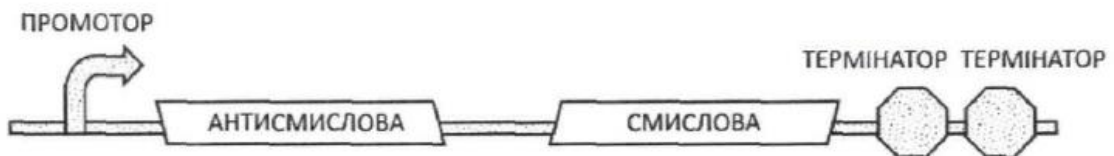
15 27. Транскрипційний термінатор за п. 25, який **відрізняється** тим, що кожна зі шпильок містить стеблову ділянку з менше ніж 3 неспареними нуклеотидами.

28. Транскрипційний термінатор за п. 24, який **відрізняється** тим, що кожна зі шпильок містить стеблову ділянку без неспарених нуклеотидів.

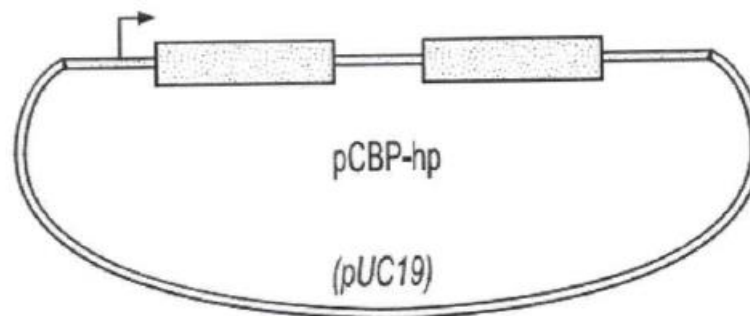
29. Транскрипційний термінатор за п. 24, який **відрізняється** тим, що послідовність нуклеїнової кислоти вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 18 та 21.



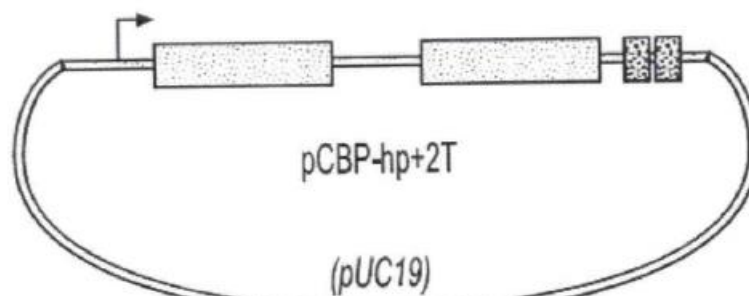
ФІГ. 1А.



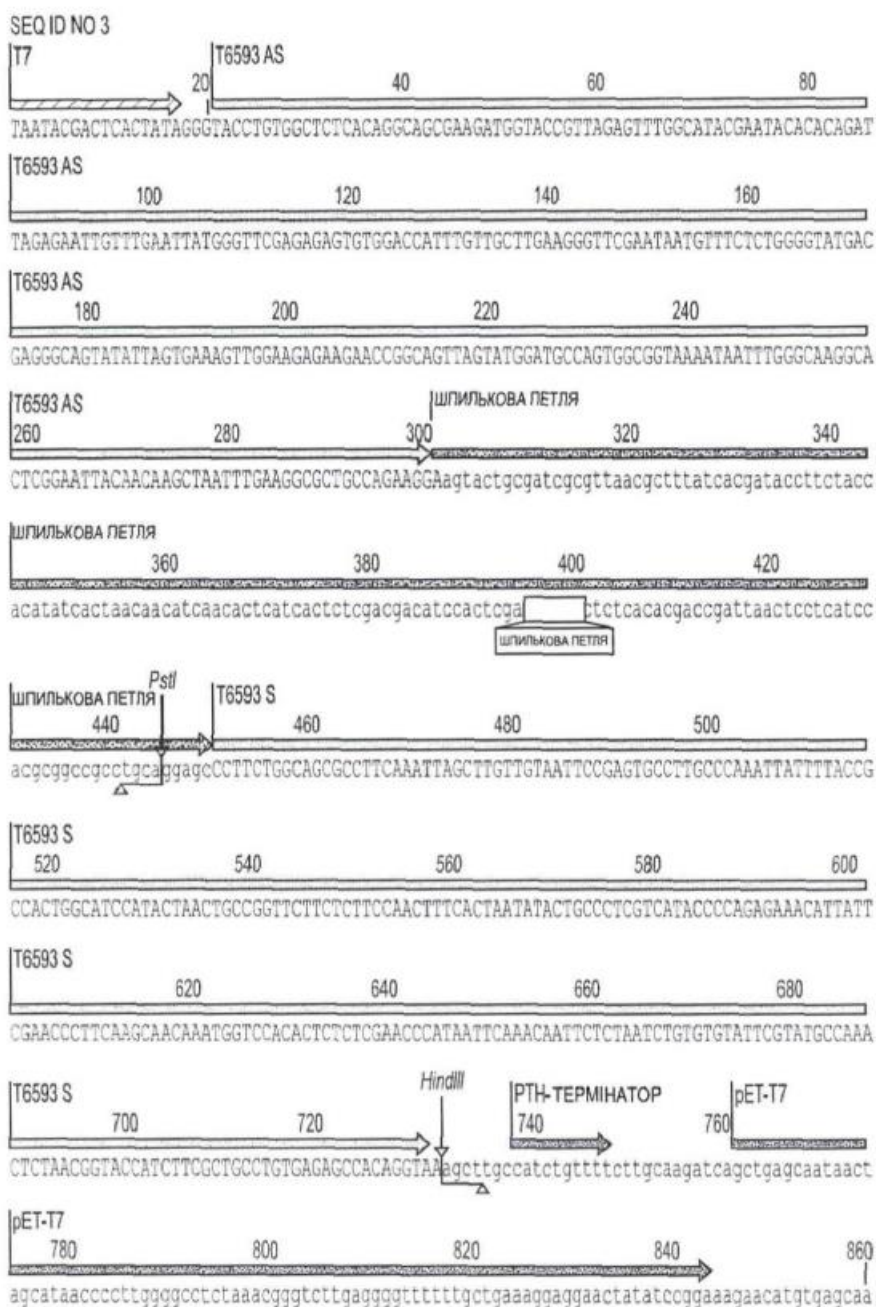
ФІГ. 1В.



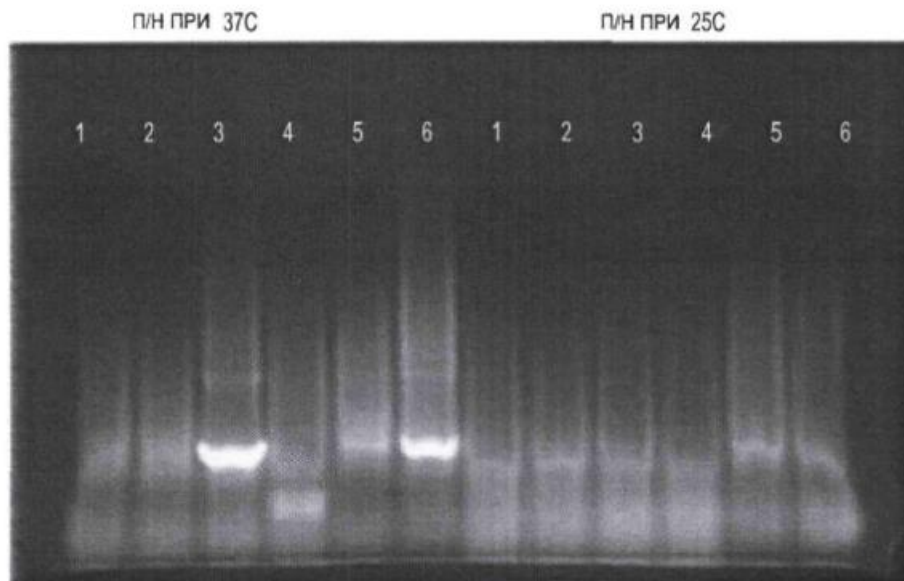
ФІГ. 2А.



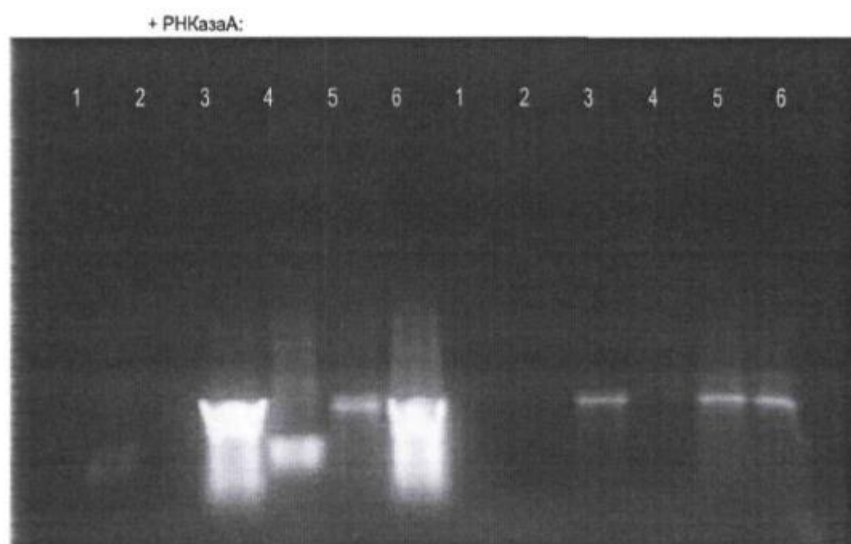
ФІГ. 2В.



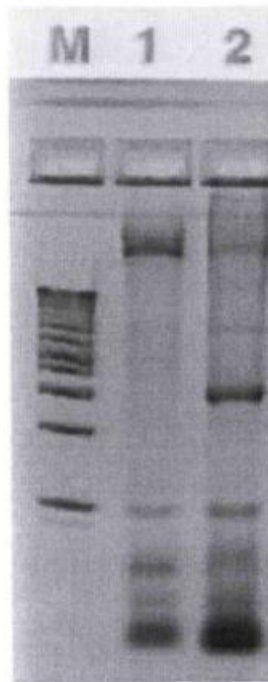
ФІГ. 2С.



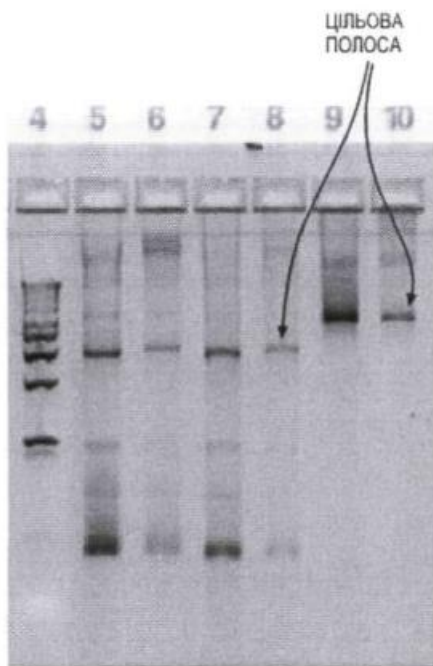
ФИГ. 3А.



ФИГ. 3В.

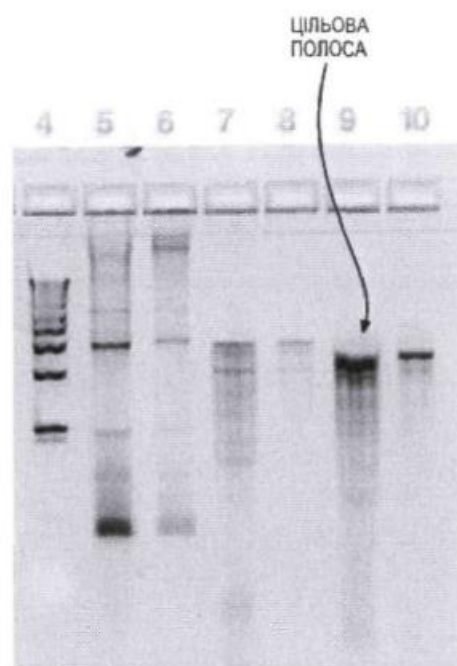


ФІГ. 4.



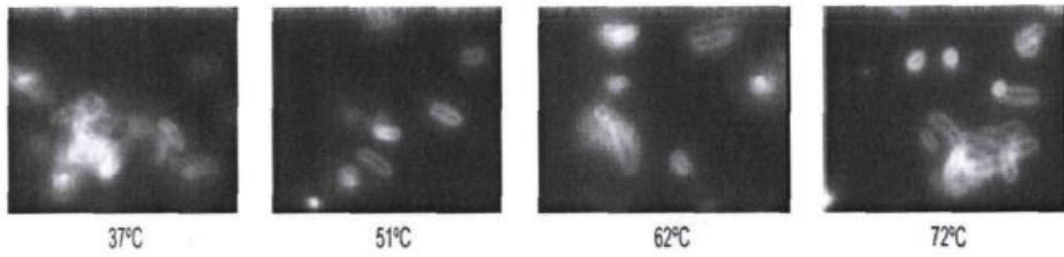
-РНКазА

ФІГ. 5А.

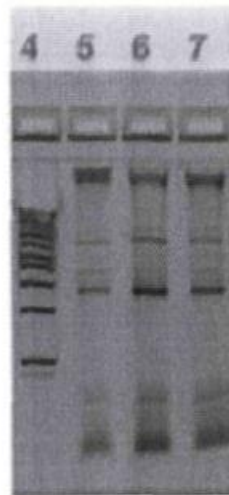


+РНКазА

ФІГ. 5В.



ФІГ. 6.



длРНК БАКТЕРІЇ DV49

- 4. МАРКЕР
- 5. AIM (СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ САМОІНДУКЦІЇ) (ВИХІД 40 мг/л)
- 6. SUPERBROTH + СЕРЕДОВИЩЕ (ВИХІД 207 мг/л)
- 7. PLASMID + СЕРЕДОВИЩЕ (ВИХІД 96 мг/л)

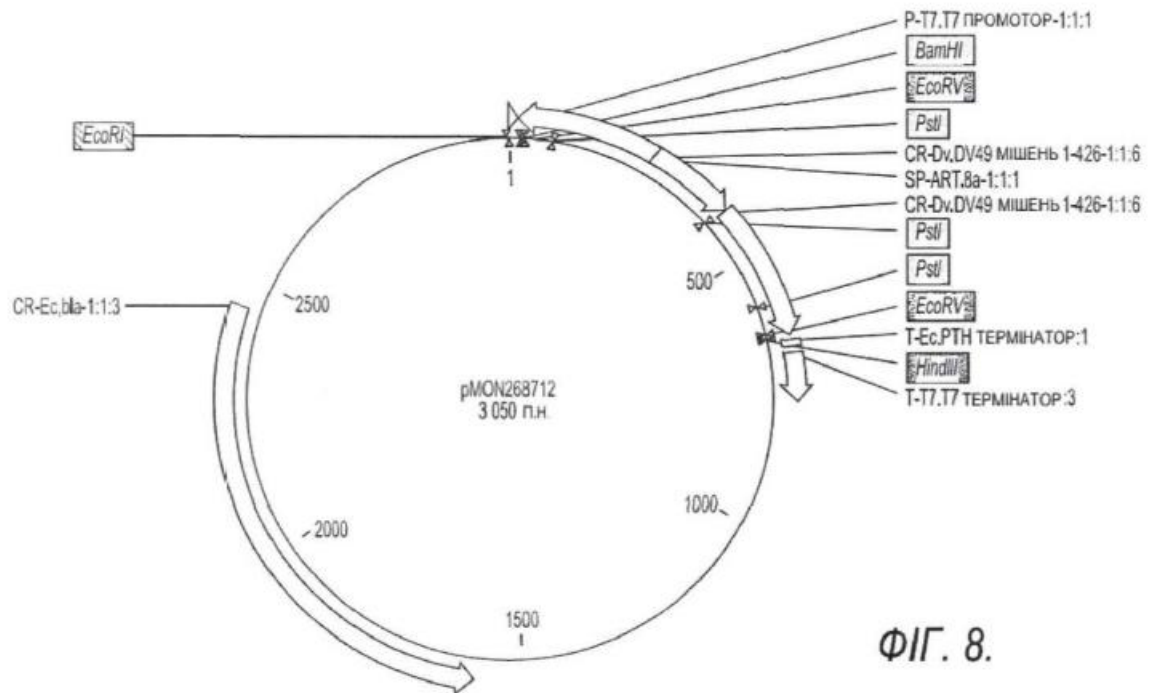
ФІГ. 7А.



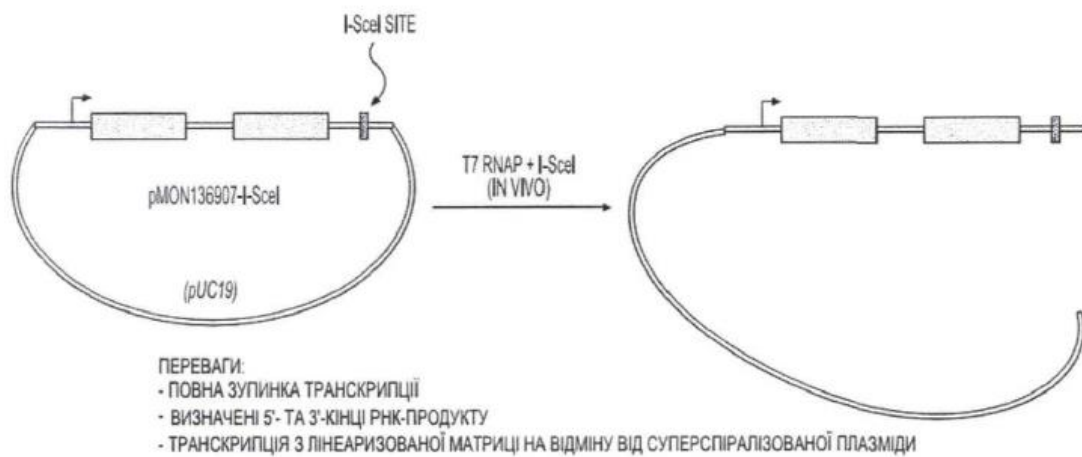
длРНК БАКТЕРІЇ СВР

- 4. МАРКЕР
- 5. SUPERBROTH + СЕРЕДОВИЩЕ (ВИХІД 207 мг/л)

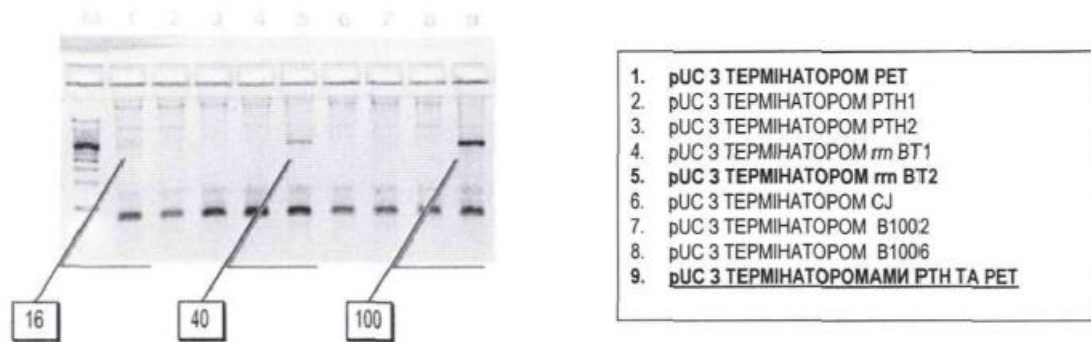
ФІГ. 7В.



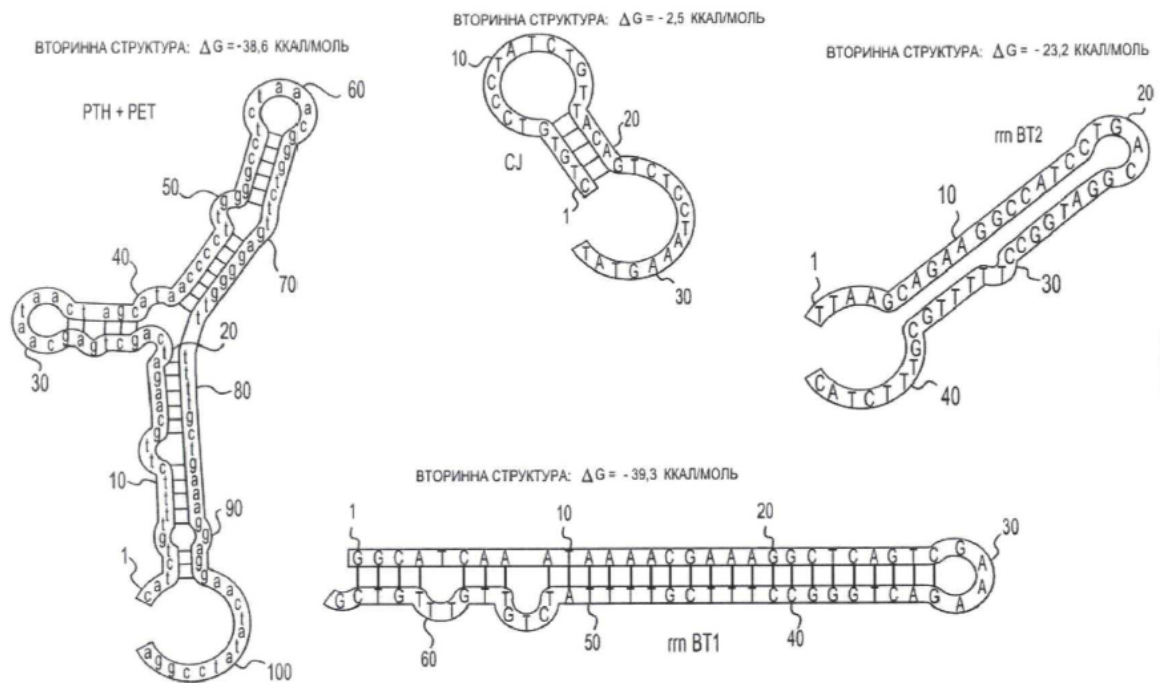
ТРАНСКРИПЦІЯ "RUN OFF" З Т7 RNAP IN VIVO



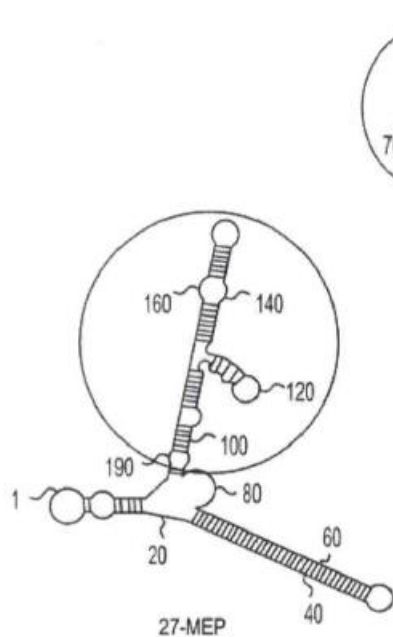
ФІГ. 9.



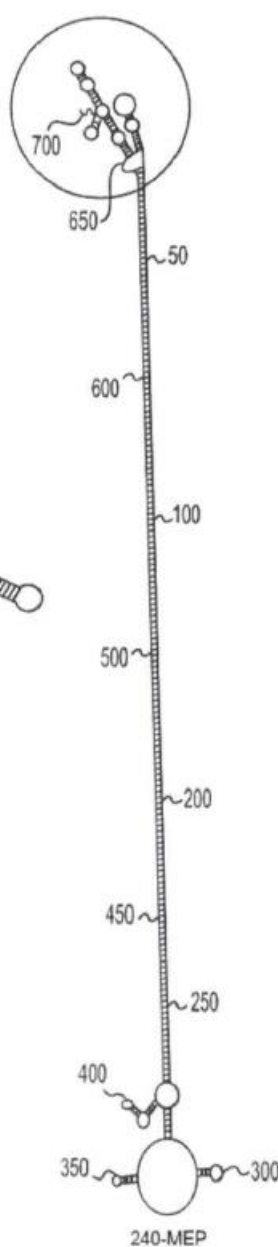
ФІГ. 10.



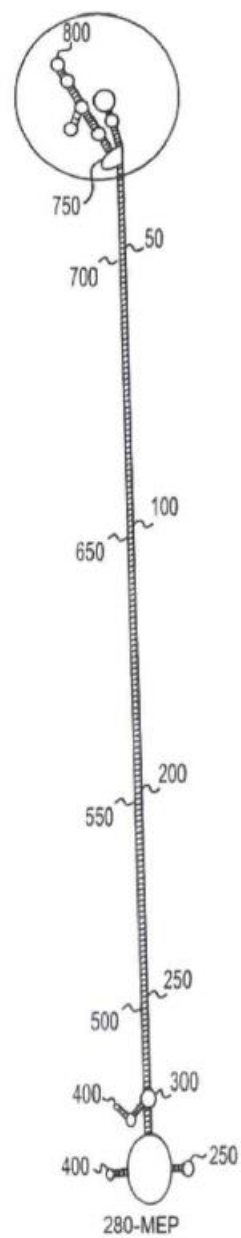
ФІГ. 11.



ΦΙΓ. 12Α.



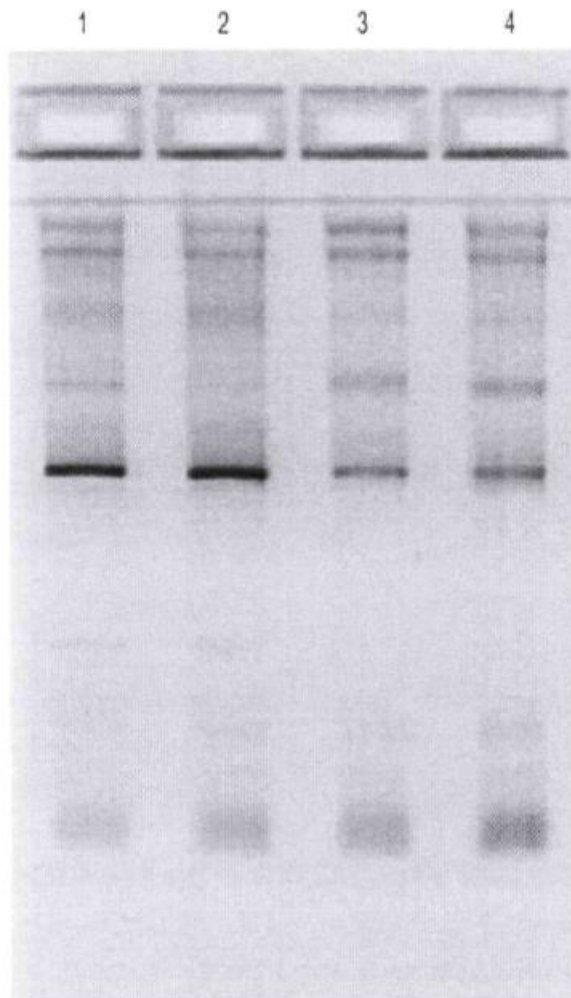
ΦΙΓ. 12Β.



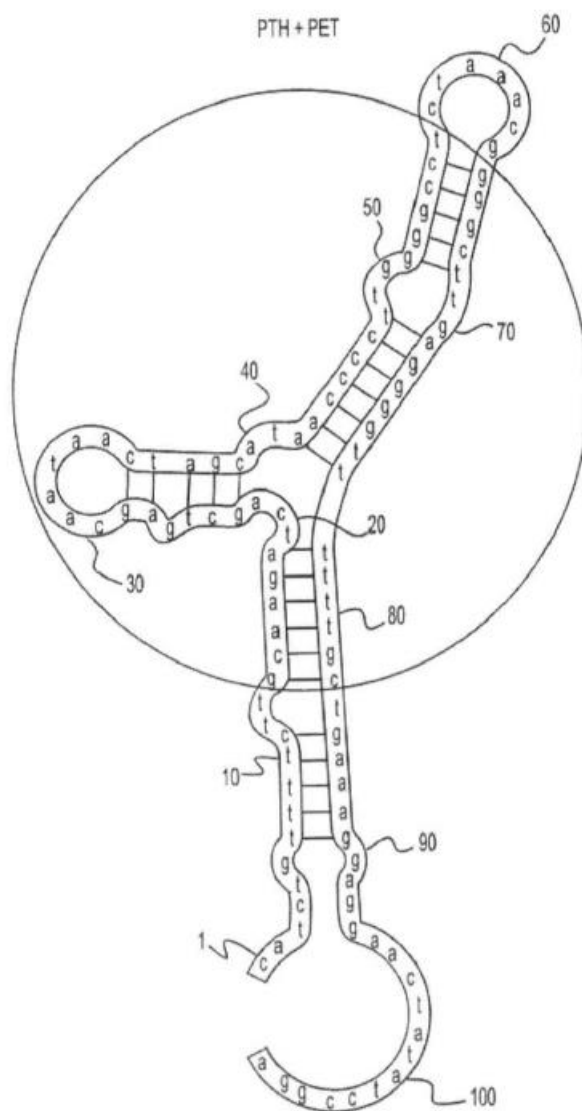
ΦΙΓ. 12C.



ФІГ. 13.

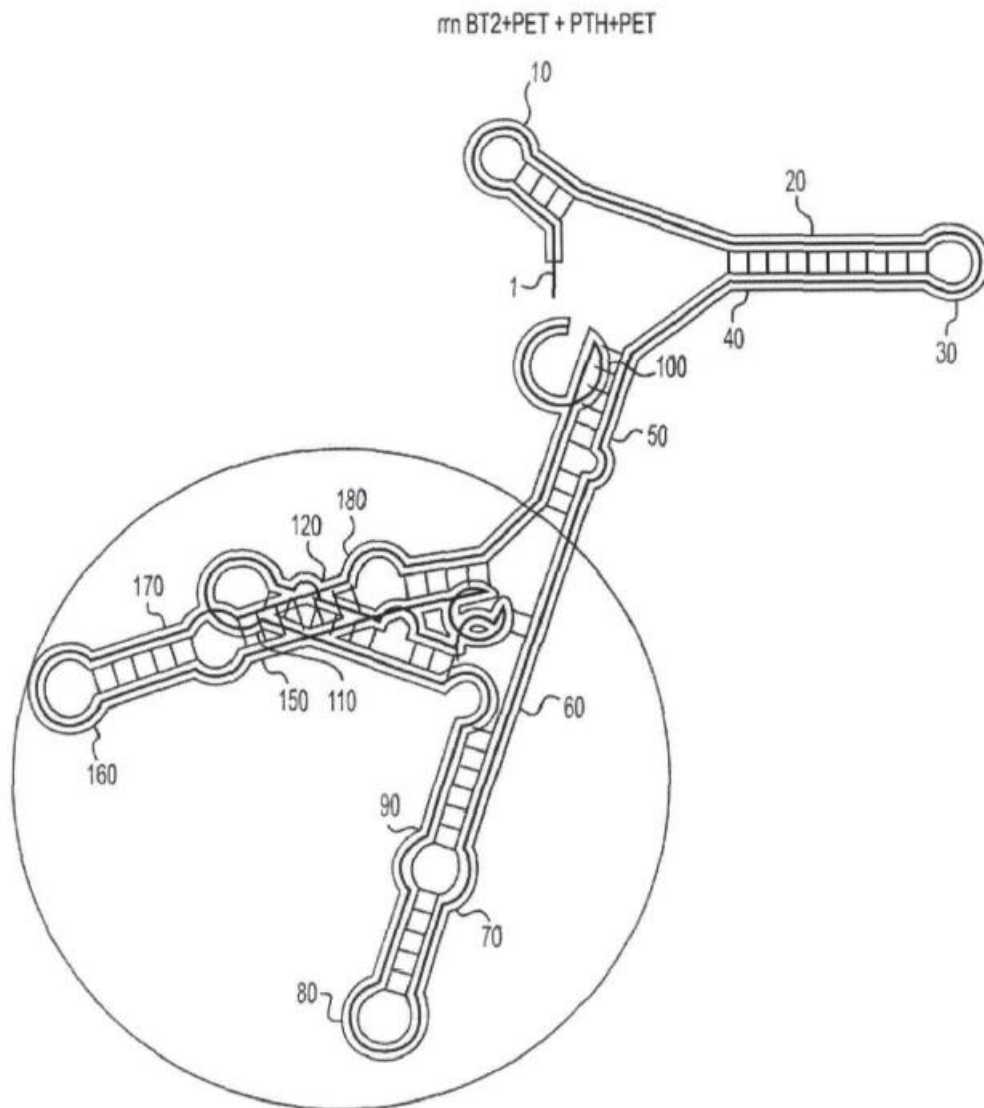


ΦΙΓ. 14.



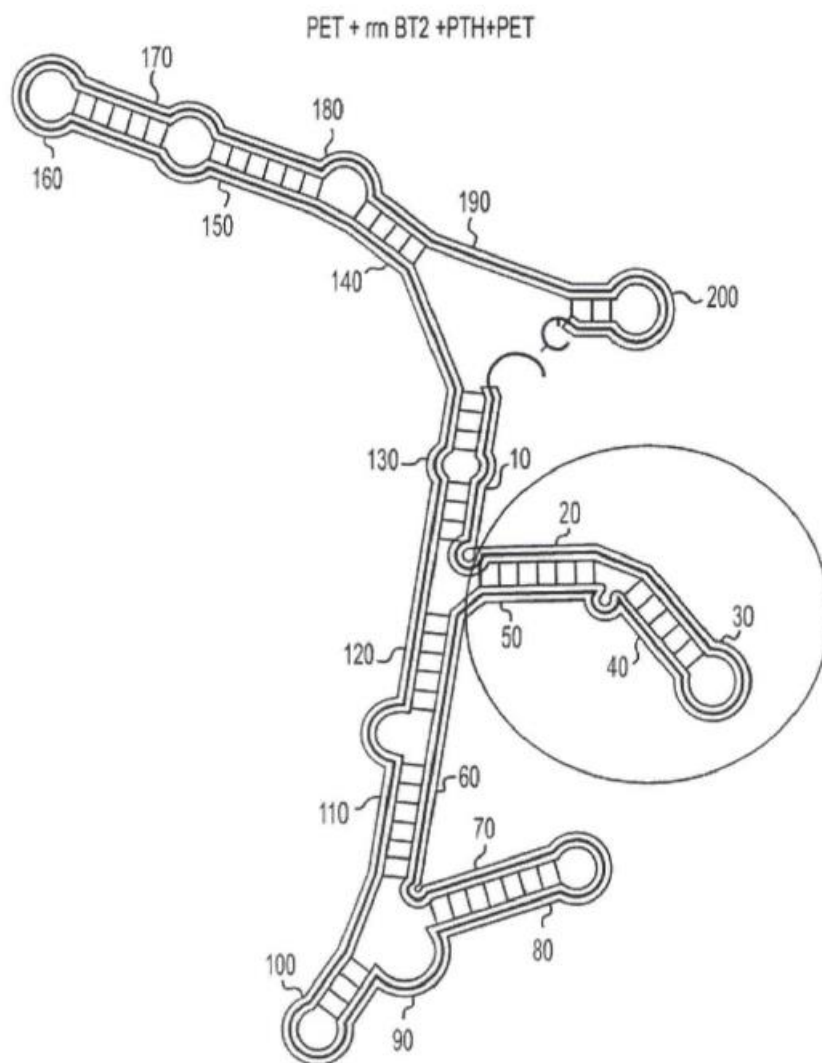
2 СУСІДНІ
СЕРЕДНІ ШПИЛЬКИ

ФІГ. 15А.



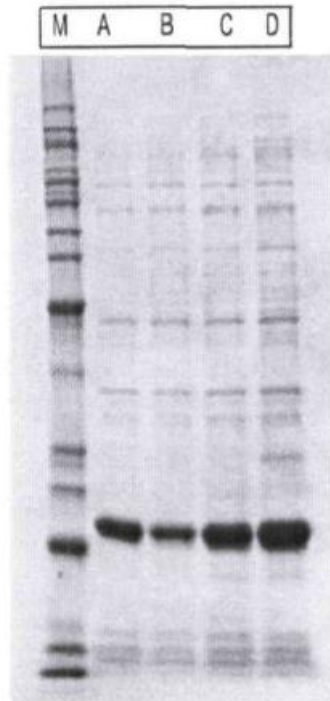
3 СУСІДНІ СЕРЕДНІ
ШПИЛЬКИ

ФІГ. 15В.



1 СЕРЕДНЯ ШПИЛЬКА

ФІГ. 15С.



ΦΙΓ. 16.

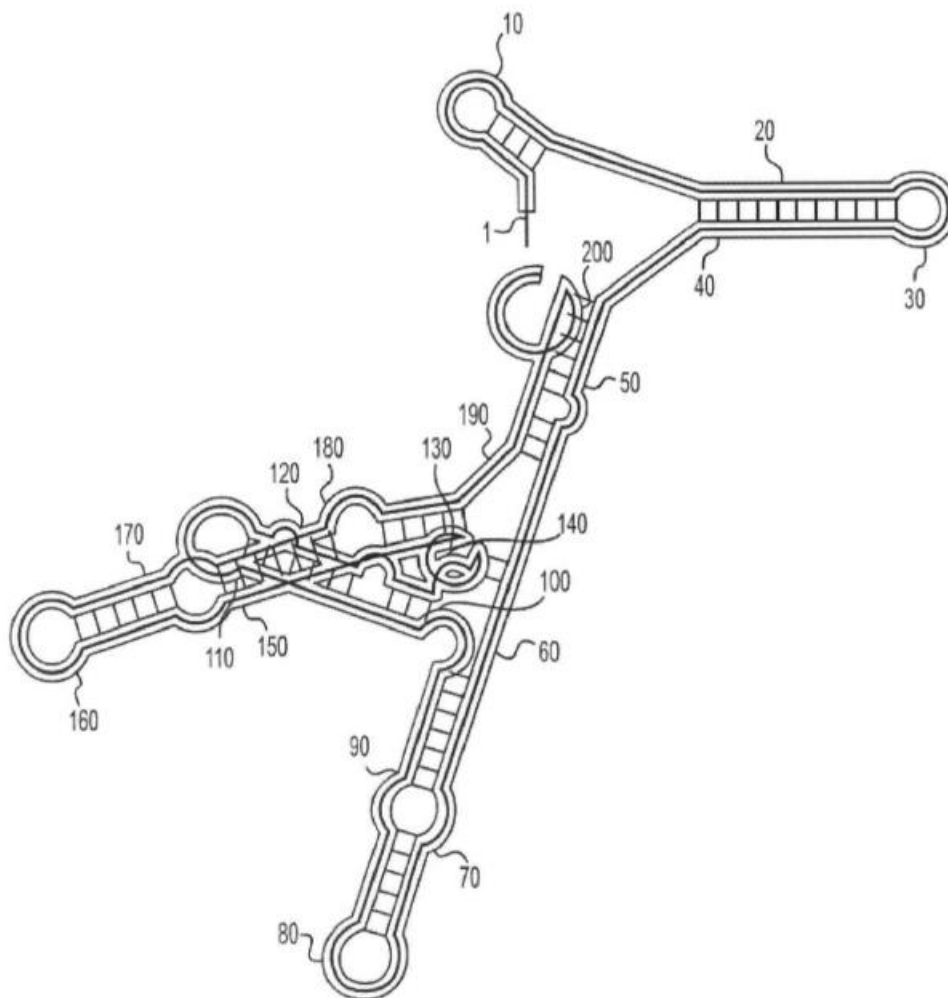
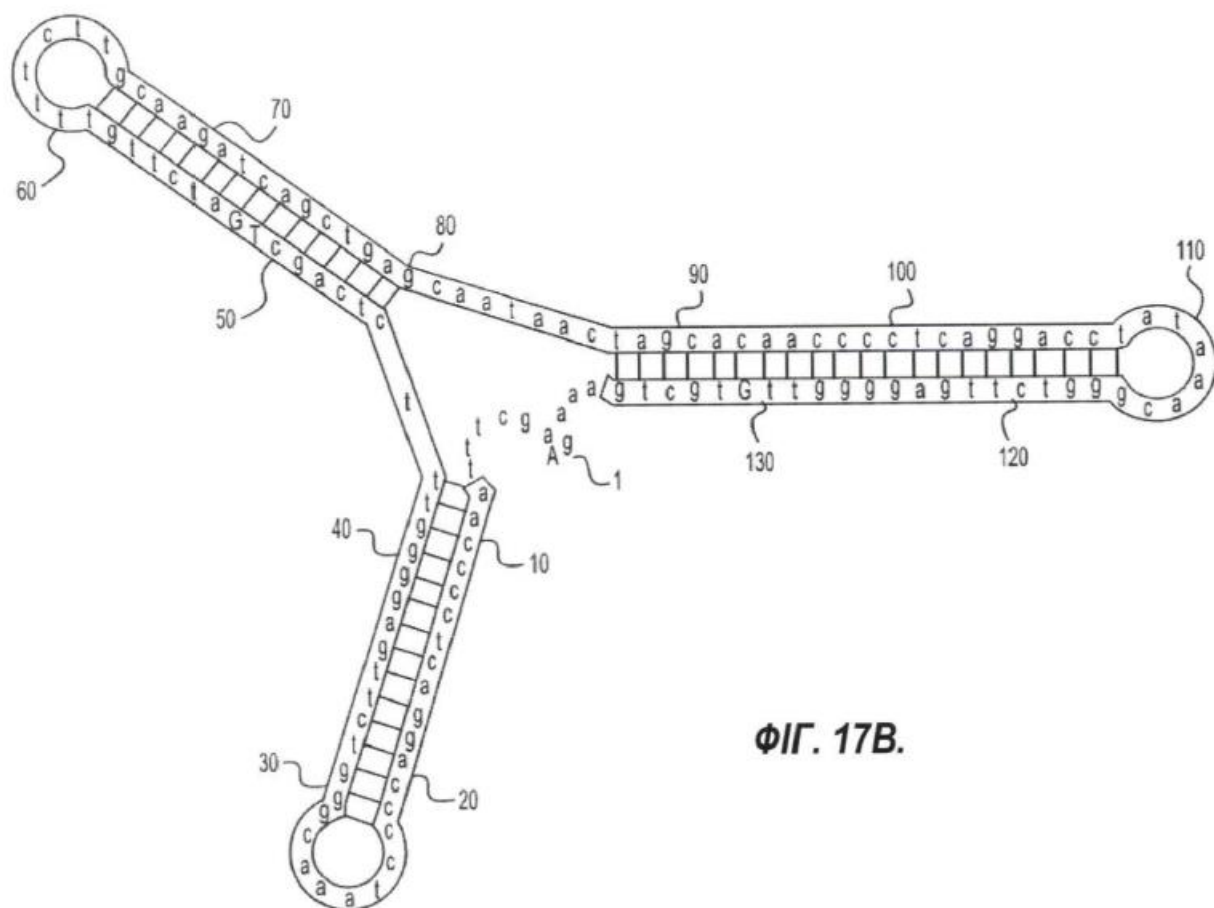
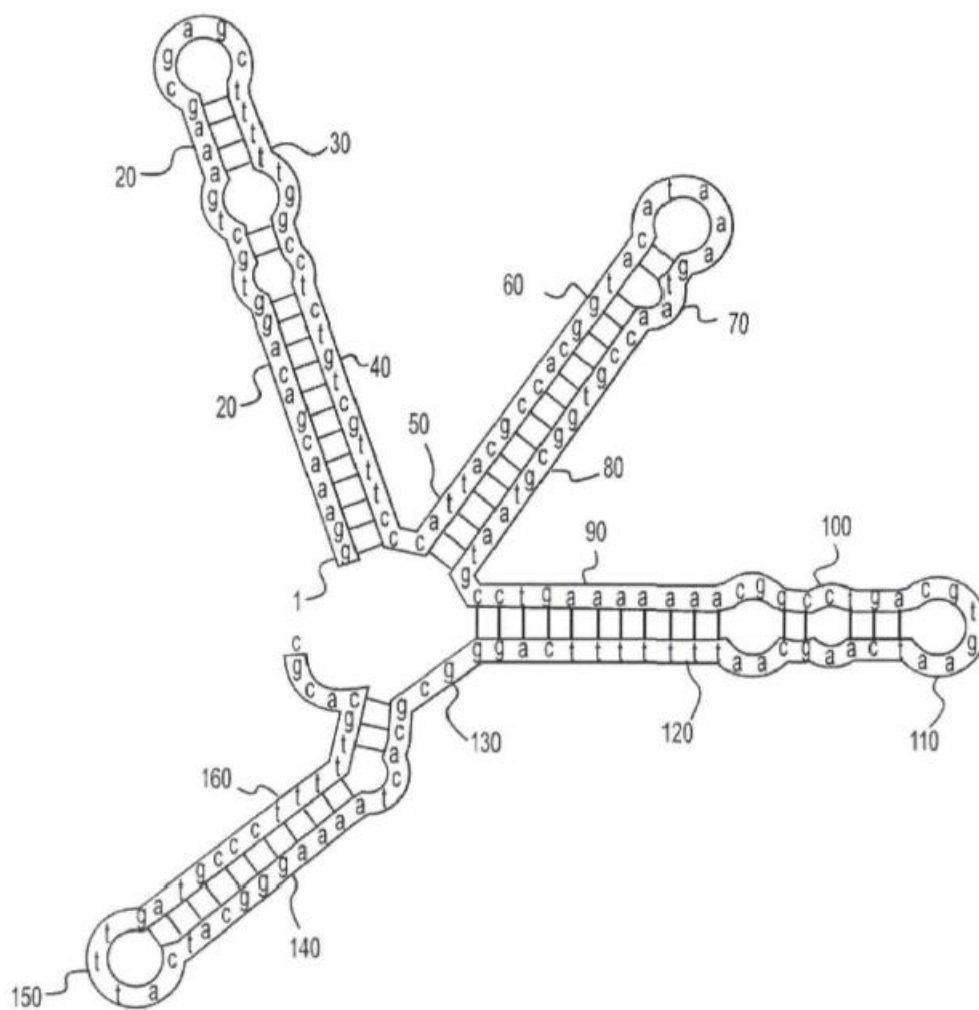
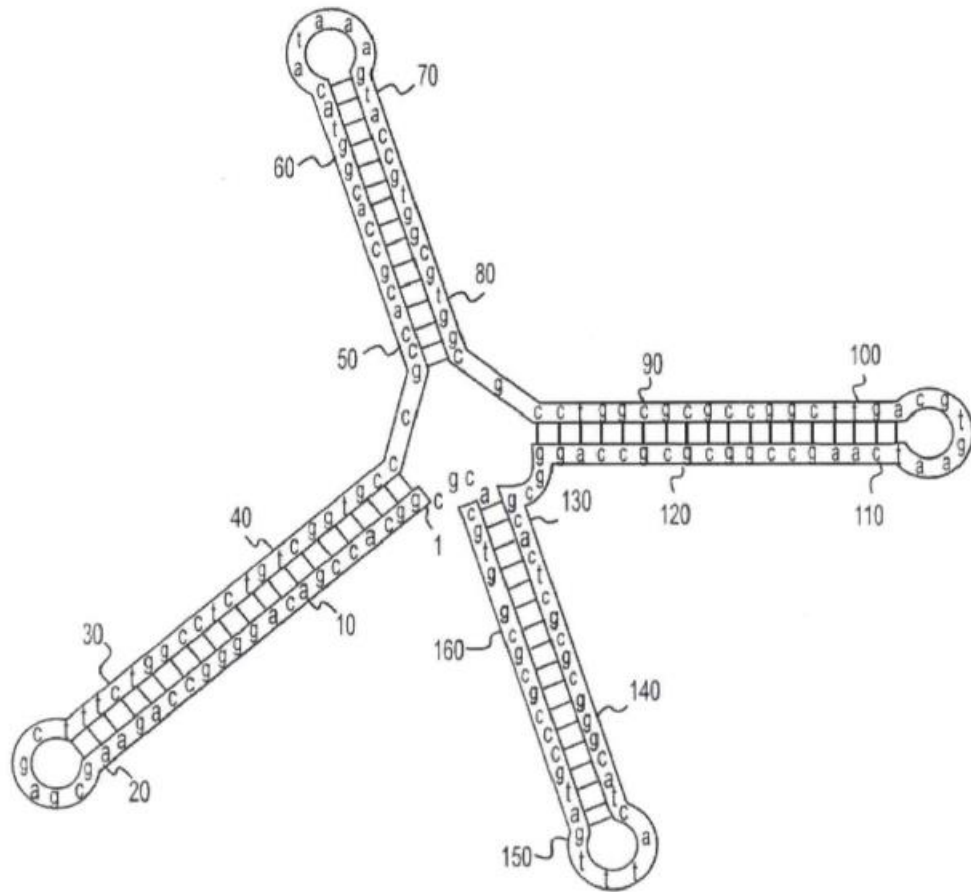


FIG. 17A.





ФІГ. 17С.



ФІГ. 17D.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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