УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111592** (13) **C2**

(51) МПК
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2013 01234**

(22) Дата подання заявки: **05.07.2011**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.05.2016**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/362,109**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **07.07.2010**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **11.03.2013, Бюл.№ 5**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.05.2016, Бюл.№ 10**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/US2011/042932, 05.07.2011**

(72) Винахідник(и):
Гразер Герсон (DE/US),
Будро Ерік (CA/US)

(73) Власник(и):
СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ,
Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Switzerland (CH)

(74) Представник:
Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2010043928 A1, 22.04.2010
ANONYMOUS: "Syngenta Biotechnology, Inc. Insect Resistant MIR162 Corn. OECD Unique Identifier: SYN-IR162-4. Draft Environmental Assessment", USDA, APHIS, MD, USA, December 2009, pages 1-41, URL: http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/07_25301_pea.pdf
Y. PARK ET AL: "Enhancement of Bacillus thuringiensis Cry3Aa and Cry3Bb Toxicities to Coleopteran Larvae by a Toxin-Binding Fragment of an Insect Cadherin", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 10, 15.05.2009, pages 3086-3092
EFSA Panel on Genetically modified Organisms: "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2007-50) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize Bt11 x MIR604for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds.", EFSA journal, vol. 8, no. 5:1614, 18.05.2010, pages 1-30, URL: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1614.pdf

UA 111592 C2

(54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ НАД ТВЕРДОКРИЛИМИ КОМАХАМИ-ШКІДНИКАМИ

(57) Реферат:

Винахід розкриває композиції та способи контролю над твердокрилими шкідниками. Зокрема, забезпечуються нові комбінації інсектицидних білків з підвищеною токсичністю щодо твердокрилих комах-шкідників, таких як кукурудзяний кореневий черв'як.
Спосіб контролю над твердокрилими комахами-шкідниками включає доставку твердокрилому шкіднику або в його довкілля композиції, що містить активний щодо твердокрилих білок Cry3A і

активний щодо лускокрилих білок Cry1Ab, де композиція контролює твердокрилого шкідника більшою мірою, ніж можна було б очікувати за рахунок будь-якого окремого активного щодо твердокрилих білка, включеного в дану композицію окремо.

[0001] Даний винахід належить, у цілому, до боротьби з шкідниками, які викликають пошкодження сільськогосподарських культур у процесах живлення, а конкретніше до боротьби з твердокрилими шкідниками за допомогою композиції, що включає синергічні рівні активного щодо твердокрилих білкового токсину і активного щодо лускокрилих білкового токсину. Даний винахід додатково належить до композиції та способів використання такої композиції, що включає білкові токсини.

ПЕРЕДУМОВИ ДАНОГО ВИНАХОДУ

[0002] Твердокрилі комахи вважаються деякими з найбільш важливих шкідників сільськогосподарських культур. Наприклад, види кукурудзяного кореневого черв'яка є найбільш руйнівними шкідниками кукурудзи, викликаючи збитки, що оцінюються більш ніж в 1 мільярд доларів щорік. Важливі види кукурудзяного шкідника кореневого черв'яка включають: Diabrotica virgifera virgifera, західний кукурудзяний кореневий черв'як; D. longicornis barberi, північний кукурудзяний кореневий черв'як, D. undecimpunctata howardi, південний кукурудзяний кореневий черв'як, і D. virgifera zeae, мексиканський кукурудзяний кореневий черв'як. Колорадський жук (CPB; Leptinotarsa decemlineata) є іншим прикладом твердокрилої комахи, яка являє собою серйозного шкідника картоплі, томату і баклажана по всьому світу.

[0003] Твердокрилих шкідників, головним чином, контролюють за допомогою інтенсивних застосувань хімічних пестицидів, які діють через інгібування зростання комах, запобігання живленню комах або розмноженню або викликають загибель. Можна, таким чином, досягти відповідного контролю комах, але ці хімічні речовини можуть інколи також впливати на інших корисних комах. Іншою проблемою, що виникає в результаті широкого вживання хімічних пестицидів, є поява резистентних видів комах. Її частково зменшили за допомогою різних агротехнічних прийомів щодо резистентності, але існує потреба, що збільшується, в альтернативних засобах контролю шкідників.

[0004] Cry-білки Bacillus thuringiensis (Bt) (також звані δ-ендотоксини) являють собою білки, які формують кристалічний матрикс у Bacillus, які, як відомо, мають інсектицидну активність при поглинанні певними комахами. Більш 180 голотипів Cry-білків у 58 сімействах були ідентифіковані й названі. Різні Cry-білки були класифіковані на основі їх спектру активності та гомології послідовності. До 1990 р. головні класи визначали за їх спектром активності (Hofte and Whitely, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255), але зовсім недавно була розроблена нова номенклатура, яка систематично класифікує Cry-білки на основі гомології амінокислотної послідовності, швидше чим на особливостях цільових комах (Crickmore et al. 1998, Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62:807-813).

[0005] Гени, що кодують Cry-білки, були виділені, а їх експресія в сільськогосподарських культурах, як було показано, забезпечувала інший інструмент для контролю над важливими з економічного погляду комахами-шкідниками. Такі трансгенні рослини, які експресують Cry-білки, були комерціалізовані, даючи можливість фермерам зменшувати або збільшувати вживання хімічних засобів контролю над комахами. Активні щодо твердокрилих Cry-білки, придатні для трансгенних рослин, включають, наприклад, Cry3A, Cry3B і комплекс Cry34/Cry35. Приклади активних щодо лускокрилих Cry-білків, які були експресовані в трансгенних рослинах, включають, наприклад, Cry1A (наприклад, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac), Cry1B, Cry1F і Cry2, серед інших.

[0006] Інше сімейство інсектицидних білків, що продукуються видами Bacillus протягом вегетативної стадії зростання (вегетативні інсектицидні білки (Vip)), були також ідентифіковані. У патентах США №№ 5877012, 6107279 і 6137033, які включені в даному документі за допомогою посилання, описано новий клас інсектицидних білків під назвою Vip3. В інших розкриттях, включаючи WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 і WO 99/57282, були також ідентифіковані гомологи білків класу Vip3. Послідовності, які кодують Vip3, кодують приблизно 88 кДа білки, які мають інсектицидну активність щодо широкого спектру лускокрилих шкідників, включаючи, але без обмежень, совку-іпсилон (BCW, Agrotis ipsilon), совку трав'яну (FAW, Spodoptera frugiperda), листовійку-брунькоїда тютюну (TBW, Heliothis virescens), точильника цукрової тростини, (SCB, Diatraea saccharalis), точильника кукурудзяного стебла малого (LCB, Elasmopalpus lignosellus) і совку бавовняну (CEW, Helicoverpa zea), а при експресії в трансгенних рослинах, наприклад, кукурудзі (Zea mays), надають захист для рослини від пошкодження, що викликане при поїданні комахою.

[0007] Існує постійна потреба в композиціях і способах вживання таких композицій з інсектицидною активністю, наприклад, для вживання при захисті сільськогосподарських культур або контролі над хворобою, опосередкованої комахами. Необхідно, щоб нові композиції здолали проблему стійкості до існуючих інсектицидів або запобігли розвитку стійкості до існуючих підходів з використанням трансгенних рослин. В ідеалі такі композиції мають високу

токсичність і є ефективними при оральному поглинанні цільовим шкідником. Таким чином, будь-який винахід, який забезпечив композиції, в яких будь-які з цих властивостей посилені, являтиме крок вперед у теперішньому рівні техніки.

КОРОТКИЙ ОПИС ДАНОГО ВИНАХОДУ

[0008] Даний винахід забезпечує покращені композиції та способи контролю над твердокрилими комахами-шкідниками, які включають нанесення на місце, де твердокрила комаха може поглинути синергічно ефективну кількість щонайменше одного активного щодо твердокрилих токсину і щонайменше одного активного щодо лускокрилих токсину. Додатково забезпечується спосіб посиленого захисту трансгенної сільськогосподарської культури від пошкодження, викликаного нападом і зараженням твердокрилими комахами.

ВИЗНАЧЕННЯ

[0009] Для ясності певні визначення, вживані в даному описі, визначають і представляють таким чином.

[0010] "Активність" означає, що білкові токсини і комбінації таких токсинів діють як орально активні засоби контролю над комахами, справляють токсичну дію або здатні порушувати або стримувати живлення комах, які можуть або не можуть викликати загибель комахи. Якщо композицію даного винаходу доставляють комасі, результатом є типово загибель комахи, або комаха не живиться джерелом, яке робить доступною композицію комасі. Такою композицією може бути трансгенна рослина, яка експресує комбінації токсинів даного винаходу. Одним прикладом є трансгенна кукурудза, яка експресує модифікований Cry3A-білок і Cry1Ab-білок, який викликає синергічну активність щодо живлення кукурудзяного кореневого черв'яка на трансгенній кукурудзі.

[0011] "Контроль" над комахами або "контролювання" комах означає пригнічувати за допомогою токсичної дії здатність комах-шкідників виживати, зростати, живитися і розмножуватися або обмежити пов'язане з комахами пошкодження або втрату сільськогосподарських культур. "Контроль" над комахами може означати або може не означати знищення комах, хоча це переважно означає знищення комах.

[0012] Як використовується в даному документі, визначення "кукурудза" означає Zea mays або маїс та включає всі сорти рослин, які можна схрещувати з кукурудзою, включаючи види дикого маїсу.

[0013] "Доставляти" або "доставка" композиції або токсину означає, що композиція або токсин контактує з комахою, приводячи до токсичної дії та боротьби з комахою. Дану композицію або токсин можна доставляти багатьма визнаними способами, наприклад, орально шляхом поглинання комахою за посередництва експресії в трансгенній рослині, складеної білкової композиції(ій), розпилюваної білкової композиції(ій), матриці з приманкою або будь-якої іншої визнаної в теперішньому рівні техніки системи доставки токсину.

[0014] "Ефективна кількість для контролю над комахами" означає ту концентрацію токсину або токсинів, яка пригнічує за допомогою токсичної дії здатність комах виживати, зростати, живитися і розмножуватися або обмежує пов'язане з комахами пошкодження або втрату сільськогосподарських культур. "Ефективна кількість для контролю над комахами" може означати або може не означати знищення комах, хоча воно переважно означає знищення комах.

[0015] "Касета експресії", як використовується в даному документі, означає нуклеїновокислотну послідовність, здатну до спрямованої експресії окремої послідовності нуклеїнової кислоти у відповідній клітині хазяїна, яка включає промотор, функціонально пов'язаний з послідовністю нуклеїнової кислоти, яка функціонально пов'язана з сигналами термінації. Вона також типово включає послідовності, необхідні для належної трансляції послідовності нуклеїнової кислоти. Касета експресії, що включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка становить інтерес, може бути химерною, означаючи, що щонайменше один з її компонентів є гетерологічним щодо щонайменше одного з її інших компонентів. Касета експресії може також бути такою, що зустрічається в природі, але була отримана в рекомбінантної формі, придатній для гетерологічної експресії. Типово, проте, касета експресії є гетерологічною щодо хазяїна, тобто окрема послідовність нуклеїнової кислоти касети експресії не зустрічається в природі в клітині хазяїна, і її слід було вводити в клітину хазяїна або попередник клітини хазяїна шляхом явища трансформації. Експресія послідовності нуклеїнової кислоти в касеті експресії може знаходитися під контролем конститутивного промотора або індуцибельного промотора, який ініціює транскрипцію, лише коли клітина хазяїна зазнає дії певної окремої зовнішньої стимул-реакції. В разі багатоклітинного організму, такого як рослина, промотор може також бути специфічним до окремої тканини, або органу або стадії розвитку.

[0016] "Подія MIR604", або "MIR604 подія", або "MIR604" означає трансгенну подію

кукурудзи, розкриту в патенті США № 7361813 (включений у даний документ за допомогою посилання), яка має включений в неї геном трансген cry3A055, розкритий у патенті США № 7230167, і трансген pmi, розкритий у патенті США № 5767378. Таким чином, MIR604 включає перший трансген, який кодує інсектицидний білок Cry3A055 (модифікований Cry3A або mCry3A), придатний для контролю над комахами-шкідниками кукурудзяних кореневих черв'яків (Diabrotica spp.), і другий трансген, який кодує фермент фосфоманнозоізомеразу (PMI), придатний як маркер, що обирають, який дає кукурудзі змогу використовувати манозу як джерело вуглецю.

[0017] "Подія MIR162", або "MIR162 подія", або "MIR162 подія" означає трансгенну подія кукурудзи, розкриту в міжнародній публікації WO 07/142840, в геном якої включений трансген vip3Aa20 і трансген pmi. Таким чином, MIR162 включає перший трансген, який кодує інсектицидний білок Vip3Aa20, придатний для контролю над лускокрилими комахами-шкідниками, і другий трансген, який кодує фермент фосфоманнозоізомеразу (PMI), придатний як маркер, що обирають, який дає можливість кукурудзі використовувати манозу як джерело вуглецю.

[0018] "Подія Bt11", або "Bt11 подія", або "Bt11" означає трансгенну подію кукурудзи, розкриту в патенті США № 6114608 (включений в даний документ за допомогою посилання), у геном якої включений трансген cry1Ab і трансген pat. Таким чином, Bt11 включає перший трансген, який кодує інсектицидний білок Cry1Ab, придатний для контролю над лускокрилими комахами-шкідниками, і другий трансген, який кодує фермент PAT, придатний як маркер, що обирають, який надає кукурудзі стійкість до гербіцидів.

[0019] "Ген" являє собою певну ділянку, яка локалізована усередині геному і яка окрім вищезазначеної кодувальної послідовності нуклеїнової кислоти включає інші, в першу чергу регуляторні послідовності нуклеїнової кислоти, відповідальні за контроль експресії, іншими словами транскрипції та трансляції, кодувальної ділянки. Ген може також включати інші 5'- і 3'-нетрансльовані послідовності та послідовності термінації. Додатковими елементами, які можуть бути наявними, є, наприклад, інтрони.

[0020] "Ген, що становить інтерес" належить до будь-якого гена, який при перенесенні в рослину надає рослині необхідну особливість, таку як стійкість до антибіотиків, стійкість до вірусів, стійкість до комах, стійкість до хвороб або стійкість до інших шкідників, стійкість до гербіцидів, покращену харчову цінність, покращену продуктивність у промисловому процесі або змінену репродуктивну здатність. "Ген, що становить інтерес" може також бути таким, який переносять у рослини для продукції комерційно цінних ферментів або метаболітів у рослині.

[0021] Як використовується в даному документі, визначення "рослинник" означає людину або суб'єкта, який займається сільським господарством, вирощуючи живі організми, такі як сільськогосподарські культури, для харчових або сировинних матеріалів.

[0022] "Гетерологічна" послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, за природою не пов'язаною з клітиною хазяїна, в яку її вводять, включаючи чисельні копії, які не зустрічаються в природі, послідовності, яка зустрічається в природі, нуклеїнової кислоти.

[0023] "Гомологічна" послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, за природою пов'язану з клітиною хазяїна, в яку її вводять.

[0024] "Інсектицидна" визначається як токсична біологічна активність, що сприяє контролю над комахами, переважно шляхом їх знищення.

[0025] "Виділена" молекула нуклеїнової кислоти або виділений білок являє собою молекулу нуклеїнової кислоти або білок, який завдяки людині перебуває окремо від його природного оточення і, таким чином, не є природним продуктом. Виділена молекула нуклеїнової кислоти або білок можуть перебувати в очищеній формі або можуть перебувати в неприродному оточенні, такому як, наприклад, рекомбінантна клітина хазяїна. Наприклад, нативний Cry-білок у Bacillus thuringiensis не виділений, але той самий Cry-білок у трансгенній рослині є виділеним.

[0026] "Модифікований Cry3A (mCry3A)" означає ген або білок, придатний для контролю над комахами-шкідниками кукурудзяних кореневих черв'яків (Diabrotica spp.), розкритий у патенті США № 7030295, опублікованому 18 квітня 2006 р., який у даний документ включений за допомогою посилання.

[0027] "Молекула нуклеїнової кислоти" або "послідовність нуклеїнової кислоти" являє собою лінійний сегмент одно- або дволанцюгової ДНК або РНК, яку можна виділити з будь-якого джерела. У контексті даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти або послідовність нуклеїнової кислоти являє собою переважно сегмент ДНК.

[0028] "Рослина" являє собою будь-яку рослину на будь-якій стадії розвитку, зокрема насінну рослину.

[0029] "Рослинна клітина" являє собою структурну та фізіологічну одиницю рослини, що

включає протопласт і клітинну стінку. Рослинна клітина може перебувати у формі виділеної одиночної клітини або культивованої клітини або як частина більш високоорганізованої одиниці такої як, наприклад, тканина рослини, орган рослини або ціла рослина.

[0030] "Культура рослинних клітин" означає культури рослинних одиниць, таких як, наприклад, протопласти, клітини в культурі клітин, клітини в тканинах рослини, пилку, пилкових трубках, насінних зачатках, зародкових мішках, зиготах і зародках на різних стадіях розвитку.

[0031] "Рослинний матеріал" належить до листя, стебел, коріння, квіток або частин квіток, плодів, пилку, яйцеклітин, зигот, насіння, відростків, клітинних або тканинних культур або будь-яких інших частин або продуктів рослини.

[0032] "Орган рослини" являє собою окремі та видимо структуровані й диференційовані частини рослини, такі як корінь, стебло, лист, квіткова брунька або зародок.

[0033] "Тканина рослини", як використовується в даному документі, означає групу рослинних клітин, організованих у структурну і функціональну одиницю. Будь-яка тканина рослини in planta або в культурі включена. Дане визначення включає, але без обмежень, цілі рослини, органи рослин, насіння рослин, тканинну культуру і будь-які групи рослинних клітин, організованих у структурні і функціональні одиниці. Вживання даного визначення у поєднанні з або у відсутність будь-якого специфічного типу тканини рослини, як перераховано вище або щодо іншого випадку охоплено даним визначенням, не призначене для виключення будь-якого іншого типу тканини рослини.

[0034] "Трансформація" являє собою процес введення гетерологічної нуклеїнової кислоти до клітини хазяїна або організм. Зокрема, "трансформація" означає стабільну інтеграцію молекули ДНК у геном організму, що становить інтерес.

[0035] "Трансформованний/трансгенний/рекомбінантний" стосується організму хазяїна, такого як бактерія або рослина, до якого ввели гетерологічну молекулу нуклеїнової кислоти. Молекула нуклеїнової кислоти може стабільно інтегруватися в геном хазяїна, або молекула нуклеїнової кислоти може бути також наявною як позахромосомна молекула. Така позахромосомна молекула може бути такою, що самореплікується. Мається на увазі, що трансформовані клітини, тканини або рослини охоплюють не лише кінцевий продукт процесу трансформації, але й їх трансгенне потомство. "Нетрансформований", "нетрансгенний" або "нерекомбінантний" хазяїн належить до організму дикого типу, наприклад, бактерії або рослині, які не містять гетерологічну молекулу нуклеїнової кислоти.

[0036] Клас білків "Vip3", включає, наприклад, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, VipAf, Vip3Ag, Vip3Ba і Vip3Bb, і їх гомологи. "Гомолог" означає, що позначений білок або поліпептид певною мірою стосується до інших членів білків класу Vip3. "Vip3Aa20" (номер доступу в GeneBank DQ539888) являє собою Vip3 гомолог, властивий лише події MIR162. Він був створений за допомогою спонтанних мутацій, введених в оптимізований для кукурудзи ген vip3Aa19 (номер доступу в GeneBank DQ539887) протягом процесу трансформації рослини.

[0037] Номенклатура, вживана в даному документі для основ ДНК і амінокислот, є такою, як викладено в 37 C.F.R. § 1.822.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ДАНОГО ВИНАХОДУ

[0038] Даний винахід стосується композицій і способів синергічного контролю над твердокрилими комахами-шкідниками, яке включає нанесення на місце, де твердокрила комаха може живитися, синергічно ефективної композиції, що містить щонайменше один активний щодо твердокрилих токсин і щонайменше один активний щодо лускокрилих токсин. У теперішньому рівні техніки добре відомо, що якщо два незалежні білки не є токсичними окремо, вони не будуть токсичними при комбінуванні. Також добре відомо, що, комбінуючи білок без активності щодо цільового шкідника з білком, активним щодо цього цільового шкідника, неактивний білок не збільшить активність уже активного білка.

[0039] Згідно із даним винаходом у даній роботі було несподівано виявлено, що вживання комбінації щонайменше одного активного щодо твердокрилих білкового токсину і щонайменше одного активного щодо лускокрилих білкового токсину демонструє значну синергічну дію (тобто кінцевий контроль над твердокрилими комахами значно більший, ніж той, який можна було передбачити з контролю над твердокрилими комах активним щодо твердокрилих токсином, вживаним окремо). Дану синергічну дію забезпечує комерційно застосовний рівень контролю над твердокрилими комахами і допомагає зменшити розвиток стійкості комах до окремого токсину.

[0040] У одному варіанті здійснення даний винахід охоплює спосіб контролю над твердокрилою комахою-шкідником, причому спосіб включає доставку твердокрилому шкідникові або в його довкілля композиції, що містить щонайменше один активний щодо твердокрилих білок і щонайменше один активний щодо лускокрилих білок, де дана композиція контролює

твердокрилого шкідника більшою мірою, чим можна було б чекати за рахунок будь-якого окремого активного щодо твердокрилих білка, включеного в цю композицію окремо.

[0041] В одному аспекті даного варіанта здійснення активний відносно твердокрилих білок являє собою модифікований Cry3A, а активний відносно лускокрилих білок являє собою білок Cry1 або білок Vip3. Ще в одному варіанті здійснення Cry1-білок являє собою Cry1Ab. Приклади Cry1Ab-білка мають наступні номери доступу до GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) і Cry1Ab26 (HQ847729). Ще в одному варіанті здійснення Cry1Ab-білок являє собою той білок, який включений в подію Bt11 і розкритий у патенті США № 6114608. Фахівець визнає, що інші активні щодо твердокрилих Cry-білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry3B, Cry8 і Cry34/Cry35. Фахівець також визнає, що інші активні щодо лускокрилих білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1H, Cry1J, Cry2A і Cry9. Білок Vip3 можна вибрати з групи, що складається з Vip3A, Vip3B і Vip3C. В одному варіанті здійснення Vip3A -білок являє собою Vip3Aa20. Проте фахівець визнає, що інші білки Vip3 є придатними в даному винаході.

[0042] У ще одному аспекті даного варіанта здійснення твердокрилий шкідник являє собою колорадського жука або кукурудзяного кореневого черв'яка. В іншому варіанті здійснення кукурудзяний кореневий черв'як являє собою західного кукурудзяного кореневого черв'яка, північного кукурудзяного кореневого черв'яка, південного кукурудзяного кореневого черв'яка або мексиканського кукурудзяного кореневого черв'яка.

[0043] У іншому варіанті здійснення охопленого способу дана композиція являє собою трансгенну рослину, яка експресує активний щодо твердокрилих білок і активний щодо лускокрилих білок. В одному аспекті дану трансгенну рослину вибирають з групи, що складається з сої, бавовни, рапсу, каноли, овочів, соняшнику, тютюну, томату, цукрової тростини, рису, пшениці, кукурудзи, жита, ячменю, дерну і фуражної сільськогосподарської культури. У іншому аспекті трансгенна рослина являє собою трансгенну кукурудзу. У ще одному аспекті трансгенна кукурудза являє собою селекційний гібрид, що включає трансгенні події кукурудзи MIR604 і Bt11. У іншому аспекті трансгенна кукурудза являє собою селекційний гібрид, що включає трансгенні події кукурудзи MIR604, Bt11 і MIR162.

[0044] В іншому варіанті здійснення даний винахід охоплює спосіб контролю над шкідником – кукурудзяним кореневим черв'яком, причому спосіб включає доставку шкіднику – кукурудзяному кореневому черв'яку або в його довкілля композиції, що містить модифікований білок Cry3A (mCry3A) і білок Cry1Ab, де дана композиція контролює шкідника – кукурудзяного кореневого черв'яка більшою мірою, чим можна було б очікувати за рахунок білка mCry3A окремо.

[0045] В іншому варіанті здійснення дана композиція являє собою трансгенну кукурудзу. У ще одному варіанті здійснення трансгенна кукурудза включає подію MIR604 і подію Bt11.

[0046] В одному варіанті здійснення даний винахід охоплює композицію для контролю над твердокрилими, яка містить щонайменше один активний щодо твердокрилих білок і щонайменше один активний щодо лускокрилих білок, де дана композиція контролює твердокрилих шкідників більшою мірою, чим можна було б очікувати за рахунок будь-якого окремого активного щодо твердокрилих білка, включеного в дану композицію окремо.

[0047] В одному аспекті даного варіанта здійснення активний щодо твердокрилих білок являє собою модифікований Cry3A, і активний щодо лускокрилих білок являє собою білок Cry1 або білок Vip3. В іншому варіанті здійснення Cry1-белок являє собою Cry1Ab. Приклади білка Cry1Ab мають наступні номери доступу до GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) і Cry1Ab26 (HQ847729). Ще в одному варіанті здійснення білок Cry1Ab є тим білком, який включений в подію Bt11 і розкритий у патенті США № 6114608. Фахівець визнає, що інші активні щодо твердокрилих Cry-білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry3B, Cry8 і Cry34/Cry35. Фахівець також

визнає, що інші активні щодо лускокрилих білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1H, Cry1J, Cry2A і Cry9. Білок Vip3 можна вибрати з групи, що складається з Vip3A, Vip3B і Vip3C. В одному варіанті здійснення Vip3A білок являє собою Vip3Aa20. Проте фахівець у даній галузі техніки визнає, що інші білки Vip3 є придатними в даному винаході.

[0048] Ще в одному аспекті даного варіанта здійснення твердокрилий шкідник являє собою колорадського жука або кукурудзяного кореневого черв'яка. В іншому варіанті здійснення кукурудзяний кореневий черв'як являє собою західного кукурудзяного кореневого черв'яка, північного кукурудзяного кореневого черв'яка, південного кукурудзяного кореневого черв'яка або мексиканського кукурудзяного кореневого черв'яка.

[0049] Ще в одному варіанті здійснення дана композиція являє собою трансгенну рослину, яка експресує активний щодо твердокрилих білок і активний щодо лускокрилих білок. У одному аспекті трансгенну рослину вибирають з групи, що складається з сої, бавовни, рапсу, каноли, овочів, соняшнику, тютюну, томату, цукрової тростини, рису, пшениці, кукурудзи, жита, ячменю, дерну і фуражної сільськогосподарської культури. В іншому аспекті трансгенна рослина являє собою трансгенну кукурудзу. У іншому аспекті трансгенна кукурудза являє собою селекційний гібрид, що включає трансгенні події кукурудзи MIR604 і Bt11. В іншому аспекті трансгенна кукурудза являє собою селекційний гібрид, що включає трансгенні події кукурудзи MIR604, Bt11 і MIR162.

[0050] У ще одному варіанті здійснення даний винахід охоплює спосіб забезпечення рослинника засобами контролю над популяцією твердокрилих комах-шкідників, що включає постачання або продаж рослиннику трансгенного насіння, яке включає нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше один активний щодо твердокрилих білок і щонайменше один активний щодо лускокрилих білок, де трансгенні рослини, вирощені зі вказаного насіння, контролюють твердокрилих шкідників більшою мірою, чим можна було б очікувати за рахунок будь-якого окремого активного щодо твердокрилих білка, включеного в нього окремо.

[0051] У іншому варіанті здійснення активний щодо твердокрилих білок являє собою модифікований Cry3A, а активний щодо лускокрилих білок являє собою білок Cry1 або білок Vip3. У ще одному варіанті здійснення Cry1-білок являє собою Cry1Ab. Приклади білка Cry1Ab мають такі номери доступу в GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) і Cry1Ab26 (HQ847729). Ще в одному варіанті здійснення білок Cry1Ab є тим білком, який включений в подію Bt11 і розкритий у патенті США № 6114608. Фахівець у даній галузі техніки визнає, що інші активні щодо твердокрилих Cry-білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry3B, Cry8 і Cry34/Cry35. Фахівець у даній галузі техніки також визнає, що інші активні щодо лускокрилих білки є придатними в даному винаході, включаючи, але без обмежень, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1H, Cry1J, Cry2A і Cry9. Білок Vip3 можна вибрати з групи, що складається з Vip3A, Vip3B і Vip3C. В одному варіанті здійснення Vip3A білок являє собою Vip3Aa20. Проте фахівець у даної галузі техніки визнає, що інші білки Vip3 є придатними в даному винаході.

[0052] Ще в одному варіанті здійснення твердокрилий шкідник являє собою колорадського жука або кукурудзяного кореневого черв'яка. В одному варіанті здійснення кукурудзяний кореневий черв'як являє собою західного кукурудзяного кореневого черв'яка, північного кукурудзяного кореневого черв'яка, південного кукурудзяного кореневого черв'яка або мексиканського кукурудзяного кореневого черв'яка.

[0053] В іншому варіанті здійснення насіння трансгенної рослини і рослину вибирають з групи, що складається з сої, бавовни, рапсу, каноли, овочів, соняшнику, тютюну, томату, цукрової тростини, рису, пшениці, кукурудзи, жита, ячменю, дерну та фуражної сільськогосподарської культури. В іншому варіанті здійснення насіння трансгенної рослини і рослина являє собою насіння і рослину трансгенної кукурудзи.

[0054] Коекспресія щонайменше одного активного щодо твердокрилих білка і щонайменше одного активного щодо лускокрилих білка в тій самій трансгенній рослині може бути досягнута за допомогою генної інженерії рослини, щоб вона містила і експресувала всі гени, необхідні в так званому молекулярному гібриді. Як альтернатива рослину, вихідну рослину 1, можна піддавати генній інженерії для експресії певних генів, що кодують інсектицидні білки даного винаходу. Другу рослину, вихідну рослину 2, можна піддавати генній інженерії для експресії

інших певних генів, що кодують інсектицидні білки даного винаходу. Шляхом схрещування вихідної рослини 1 з вихідною рослиною 2 отримують потомство рослин, які експресують усі гени, введені вихідним рослинам 1 і 2, позначені в даному документі як "селекційний гібрид". Такий селекційний гібрид для створення композиції даного винаходу може бути досягнутий шляхом схрещування кукурудзи, що включає подію MIR604, з кукурудзою, що включає подію Bt11. Таким чином, потомство селекційного гібрида включає білок mCry3A і білок Cry1Ab, розкриті в даному документі, для забезпечення синергічного контролю над твердокрилими комахами-шкідниками.

[0055] Композиції даного винаходу, наприклад, насіння трансгенної рослини, можна також обробляти інсектицидним покриттям для насіння, як описано в патентах США №№ 5849320 і 5876739, які включені в даний документ за допомогою посилання. Де як інсектицидне покриття для насіння, так і трансгенне насіння даного винаходу є активними щодо тієї самої цільової комахи, причому дана комбінація є придатною (i) у способі додаткового посилення активності синергічної композиції даного винаходу щодо цільової комахи і (ii) в способі запобігання розвитку стійкості до композиції даного винаходу за допомогою забезпечення ще одного механізму дії щодо цільової комахи. Таким чином, даний винахід забезпечує спосіб посилення активності щодо або запобігання розвитку стійкості цільової комахи, наприклад, кукурудзяного кореневого черв'яка, що включає нанесення інсектицидного покриття для насіння на трансгенне насіння даного винаходу. Такі хімічні обробки можуть включати інсектициди, фунгіциди або нематоциди. Приклади таких інсектицидів включають, без обмежень, дінотефуран, такий як тіаметоксам, імідаклопрід, ацетаміприд, нітенпірам, нідінотефуран, хлорфенапір, тебуфенпірад, тебуфенозід, метоксифенозід, галофенозід, тріазамат, авермектін, спіносад, фіпрінол, ацефат, фенаміфос, діазинон, хлорпіріфос, хлорпіріфон-метил, малатіон, карбаріл, алдікарб, карбофуран, тіодікарб і оксаміл. Навіть у тому випадку, коли інсектицидне покриття для насіння є активним щодо різних комах, інсектицидне покриття для насіння є придатним для розширення діапазону контролю над комахами, наприклад, за допомогою додавання інсектицидного покриття для насіння, яке виявляє активність щодо лускокрилих комах, на трансгенне насіння даного винаходу, яке виявляє активність щодо твердокрилих комах, при цьому отримане покрите трансгенне насіння контролює як лускокрилих, так і твердокрилих комах-шкідників.

ПРИКЛАДИ

[0056] Даний винахід буде далі описаний за допомогою посилання на такі детальні приклади. Ці приклади забезпечують лише для ілюстрації та не призначені для обмеження, якщо не вказане інше. Стандартні методики рекомбінантної ДНК і молекулярного клонування, використані в даному описі, добре відомі в теперішньому рівні техніки й описані J. Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); T.J. Silhavy, M.L. Berman, and L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) і Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley and Sons Inc., (1988), Reiter, et al., Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Press (1992), і Schultz et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998).

Приклад 1. Взаємодія між токсинами у відношенні до колорадського жука

[0057] У даному прикладі впливу mCry3A на токсичність Cry1Ab і впливу Cry1Ab на токсичність mCry3A вимірюють за допомогою біоаналізів, тестуючи інсектицидні білки окремо і в комбінації. Подія кукурудзи Bt11 і подія кукурудзи MIR604 експресують інсектицидні білки Cry1Ab і модифікований Cry3A (mCry3A), відповідно. Cry1Ab є активним щодо певних Lepidoptera, тоді як mCry3A є активним щодо деяких видів Coleoptera. У Сполучених Штатах (США) основне застосування кукурудзи Bt11 призначене для контролю над метеликом кукурудзяним (Ostrinia nubilalis; ECB), а головними цілями кукурудзи MIR604 є західний кукурудзяний кореневий черв'як (Diabrotica virgifera virgifera; WCR) і північний кукурудзяний кореневий черв'як (Diabrotica longicornis barberi; NCR). За допомогою звичайних селекційних гібридів рослин Bt11 і MIR604 були створені гібриди маїсу Bt11 x MIR604 з пакетованими генами, які продукують як Cry1Ab, так і mCry3A. Ці гібриди маїсу забезпечують боротьбу з ECB, а також WCR і NCR.

[0058] Вживаними індикаторними організмами є ECB першої личинкової стадії, який є високочутливим до Cry1Ab і колорадський жук першої личинкової стадії (Leptinotarsa decemlineata; CPB), який є високочутливим до mCry3A. ECB є нечутливим до mCry3A, а CPB є нечутливим до Cry1Ab. Хоча CPB не є цільовим шкідником маїсу MIR604 або Bt11 x MIR604, він є більш сприйнятливим до лабораторного тестування, ніж види кореневого черв'яка, намічені за допомогою mCry3A. Личинки як ECB, так і CPB легко піддавати біоаналізу із застосуванням стандартних штучних середовищ за тих самих лабораторних умов. Оскільки перші личинкові

стадії цих видів є високочутливими або до Cry1Ab, або до mCry3A, можливість виявлення багатьох значних змін у токсичності будь-якого білка максимізована. У кожному комбінаторному біоаналізі кожен чутливий вид піддається дії високої та низької концентрації токсину, представленого LC70 і LC30, відповідно, в комбінації з високою концентрацією речовини, що не належить до токсину речовини, представленої LC90, у відповідних чутливих видах.

[0059] Різні схеми експерименту доступні для тестування взаємодій між токсинами. Схема залежить від моделі, вживаної для прогнозування впливу сумішей токсинів без взаємодії, з впливу сполук окремо; взаємодію виявляють, коли спостережувані впливи суміші відрізняються від припущень моделі. Коли токсини справляють подібні впливи так, що одну сполуку можна замінити як постійну частину іншої, нульова модель називається подібною спільною дією. Коли цю модель застосовують, у тесті на взаємодію визначають дозозалежну відповідь для фіксованого співвідношення сполук (наприклад, Tabashnik, 1992). Коли токсини діють незалежно (різні механізми дії), найкраща модель являє собою незалежну спільну дію, а в тесті на взаємодію вивчають впливи варіювальних частин сполук у факторній схемі (наприклад, Tajima et al., 2002). Обширні масиви даних для Cry1Ab і mCry3A вказують на те, що організми, чутливі до одного білка, не будуть чутливими до іншого білка; іншими словами, лише одна сполука є токсичною для окремого організму, а нульова гіпотеза полягає в тому, що суміш не справляє додаткового впливу. У таких ситуаціях взаємодія зображається різницею між токсичністю білка A окремо і його токсичністю за наявності білка B. Для організму, чутливого до білка A, по суті, не існує дозозалежної відповіді на білок B і, отже, немає підстав чекати, що концентрація білка B впливає на токсичність білка A. Таким чином, тестування впливу білка B при фіксованій концентрації являє собою простий і ефективний спосіб тестування будь-якої взаємодії. Цей спосіб найбільш схожий на "простий емпіричний підхід", описаний Tabashnik (1992).

[0060] Взаємодію між двома інсектицидними білками виявляють як статистично значущу різницю між смертністю, яка спостерігається з окремим токсичним білком, і смертністю, яка спостерігається, коли другий білок додають в комбінації з токсичним білком. ECB першої личинкової стадії піддають дії Cry1Ab при LC30 і LC70 окремо і в комбінації з високою концентрацією mCry3A, яка відповідає LC90 для CPB першої личинкової стадії. Відповідно, CPB першої личинкової стадії піддають дії mCry3A при LC30 і LC70 окремо і в комбінації з високою концентрацією Cry1Ab, яка відповідає LC90 для ECB першої личинкової стадії.

[0061] Піддавання дії чутливих видів як при їх LC30, так і LC70, дає можливість оцінити потенційну взаємодію з другим білком у двох окремих точках на кривій залежності "доза-відповідь". Дія другого білка в концентрації, яка є високотоксичною (LC90) для чутливих видів, забезпечує досить сильну дію, щоб виявити будь-яку біологічно релевантну токсичність, якщо існує взаємодія між двома білками.

[0062] Джерела Cry1Ab і mCry3A, вживані в біоаналізах, є тестованими речовинами, що продукуються шляхом надекспресії кожного білка в рекомбінантній E. coli з подальшим очищенням. Cry1Ab і mCry3A, які містяться в цих тестованих речовинах, є значною мірою еквівалентними інсектицидним білкам, які експресовані в Bt11 і MIR604 трансгенних рослинах кукурудзи, відповідно. Вживання очищених білків, що продукуються в мікроорганізмах, є переважним для вживання отриманих з рослин препаратів Cry1Ab і mCry3A. Відносно більш висока чистота отриманих з мікроорганізмів тестованих речовин передбачає більш точні визначення токсичності без втручання з боку рослинних речовин. Ці рослинні речовини можливо не наявні в рівних кількостях у матеріалах, отриманих як з Bt11-, так і MIR604, а також у контрольних матеріалах, і можуть спотворювати інтерпретацію результатів біоаналізів.

[0063] Одержання тестованої речовини Cry1Ab: тестована речовина Cry1Ab, як визначається, містить приблизно 127 мкг Cry1Ab/мл тестованої речовини (0,0127 % вага/об'єм). Після приготування тестовану речовину зберігають при приблизно 4 °C. Процесований трипсином Cry1Ab у тестованій речовині відповідає приблизно процесованому Cry1Ab, закодованому в кукурудзі Bt11. Процесований білок Cry1Ab, закодований у кукурудзі Bt11, представляє перші 615 N-кінцевих амінокислот нативного білка повної довжини Cry1Ab з B. thuringiensis підвиду kurstaki. При порівнянні переважна форма процесованого трипсином Cry1Ab у тестованій речовині являє собою білок з 587 амінокислот, що представляє той самий процесований білок Cry1Ab, наявний у кукурудзі Bt11, мінус перші 28 N-кінцевих амінокислот (Kramer, 2006). Трипсинізация Cry1Ab у кукурудзі Bt11 видаляє ці 28 N-кінцевих амінокислот (які не потрібні для інсектицидної активності) і додатково демонструє істотну еквівалентність продукованого E. Coli, процесованого трипсином Cry1Ab і процесованого Cry1Ab, продукованого в Bt11, як виміряно за допомогою SDSPAGE, Вестерн-блоттінгу, N-кінцевого секвенування, пептидного картування, біологічної активності щодо новонароджених личинок ECB відсутність

глікозування, що детектується. Таким чином, процесований білок Cry1Ab, наявний у тестованій речовині, можна вважати значною мірою еквівалентним процесованому білку Cry1Ab, закодованому в маїсі Bt11.

[0064] Одержання тестованої речовини mCry3A: тестована речовина mCry3A, як визначається, містить приблизно 90 % білка mCry3A за вагою, щоб мати біоактивність щодо чутливих видів твердокрилих і, як показано, значною мірою є еквівалентним mCry3A, яке продукується в події кукурудзи MIR604, як оцінювалося за допомогою різних біохімічних і функціональних параметрів. Після приготування тестовану речовину mCry3A зберігають при приблизно –20 °C.

[0065] Оцінювання LC30, LC70 і LC90 щодо дозозалежної відповіді ECB на Cry1Ab: біоактивність Cry1Ab оцінюється в аналізах живлення комах із застосуванням личинок ECB першої личинкової стадії відповідно до стандартних способів, відомих у теперішньому рівні техніки. Коротко, біоаналізи проводять в 24-лункових планшетах Costar (Fisher Scientific № за каталогом PD 10-047-05). Тестовані розчини готують за допомогою розведення рідкої тестованої речовини Cry1Ab в 0,6 мкМ амоній-карбонатного буфера. Сто мкл кожного розбавлення додають до 100 мкл живильного середовища для ECB (General Lepidopteran Diet від Bioserve, Inc.; Френчтаун, Нью-Джерсі, США) і ретельно перемішують. Живильне середовище для комах ECB готують відповідно до способів, відомих у теперішньому рівні техніки. Кожна лунка містить 200 мкл живильного середовища для комах, що містить концентрації Cry1Ab, які знаходяться в діапазоні від 3 до 372 нг/мл живильного середовища. Кожна обробка складається з 24 лунок з повторностями, що містять одну личинку ECB/лунку. Планшети підтримують у лабораторних умовах довкілля, що стосується температури, освітлення та відносної вологості. Для контролю над помилкою випадкової вибірки личинки випадковим чином поміщають у групи обробки. Як контроль личинки піддають дії живильного середовища для комах без тестованої речовини (живильне середовище окремо); живильного середовища для комах, обробленого тією самою концентрацією буфера, використовуваного при вживанні найвищої концентрації тестованої речовини в живильному середовищі (100 мкл приблизно 0,6 мкМ 50 мМ NH_4HCO_3, pH 9,25, буфера/100 мл живильного середовища); і живильного середовища, обробленого розчином термоінактивованої тестованої речовини Cry1Ab (30 хвилин при 100 °C) в концентрації, еквівалентній найвищій концентрації тестованої речовини (372 нг Cry1Ab/мл живильного середовища), вживаної в біоаналізі. Обробка термоінактивованим білком слугує як контроль для потенційних впливів доданих білків у живильному середовищі для комах і домішок (тобто компоненти, що не належать до Cry1Ab) у тестованій речовині. Смертність оцінюється через приблизно 144 години.

[0066] US EPA Probit Analysis Program, версія 1.5, US EPA, 1992 застосовують для визначення значень LC50 і LC90; до того ж, застосовували рівняння кутового коефіцієнта для регресії логарифма дози пробіт-взаємодії для визначення значень LC30 і LC70 у поєднанні з пробіт-таблицею з нормальним розподілом (Geigy Scientific Tables, Lentner, 1982). Інші пробіт-програми можна також застосовувати.

[0067] Оцінювання LC30, LC70 і LC90 щодо дозозалежної відповіді CPB на mCry3A: застосовуючи тестовану речовину mCry3A, LC30, LC70 і LC90 mCry3A щодо CPB першої личинкової стадії визначаються тим самим способом, як той, що описаний вище для ECB, застосовуючи стандартні способи, відомі в теперішньому рівні техніки. Тестовані розчини готують за допомогою розчинення ліофілізованої тестованої речовини у воді MilliQ®. Сто мкг кожного розбавлення додають до 100 мкг живильного середовища для CPB (Bioserve, Inc., Френчтаун, Нью-Джерсі, США) і ретельно перемішують. Живильне середовище для комах CPB готують із застосуванням способів, відомих у теперішньому рівні техніки. Кожна лунка містить 200 мкл живильного середовища для комах з концентрацією mCry3A, яка знаходиться в діапазоні від 0,01 до 5 мкг/мл живильного середовища. Як контролі личинки піддають дії живильного середовища для комах без доданої тестованої речовини (живильне середовище окремо), живильного середовища для комах, обробленого тим самим об'ємом води MilliQ, використовуваної при вживанні розчину тестованої речовини в живильному середовищі окремо, і живильного середовища, обробленого розчином термоінактивованого білка mCry3A з тестованої речовини (30 хвилин при 100 °C) у концентрації, еквівалентній найвищій концентрації тестованої речовини (5 мкг mCry3A/мл живильного середовища), вживаної в біоаналізі. Смертність оцінюється через 96 годин.

[0068] Оцінювання впливу mCry3A на токсичність Cry1Ab: Вплив mCry3A на токсичність Cry1Ab вимірюють шляхом піддавання дії ECB першої личинкової стадії LC30 (еквівалентна 27 нг Cry1Ab/мл живильного середовища) і LC70 (еквівалентна 70 нг Cry1Ab/мл живильного середовища) Cry1Ab і шляхом порівняння смертності за наявності та відсутності mCry3A.

Концентрацію mCry3A, відповідну LC90 для CPB (еквівалентна 2,4 мкг mCry3A/мл живильного середовища), визначають, як описано вище.

[0069] Біоаналіз взаємодії здійснюють із застосуванням тих самих культуральних методик і умов, описаних вище, за винятком того, що 24-лункові культуральні планшети застосовують у трьох повторностях для кожної обробки. Кожен планшет з обробкою містить 24 личинки, в цілому 72 личинки на обробку. Як контролі личинки піддають дії живильного середовища для комах без тестованої речовини (живильне середовище окремо); живильного середовища для комах, обробленого тією самою концентрацією буфера, яку використовують у вживанні найвищої концентрації тестованої речовини живильному середовищу (100 мкл приблизно 0,6 мкМ 50 мМ NH4HC03, pH 9,25 буфера/100 мл живильного середовища); живильного середовища, обробленого розчином термоінактивованого Cry1ab (30 хвилин при 100 °C) в концентрації, еквівалентній найвищій концентрації Cry1Ab (372 нг Cry1Ab/мл живильного середовища), вживаної в біоаналізі; і mCry3A в дозі 2,4 мкг/мл живильного середовища, відповідної LC90 mCry3A щодо CPB. Живильне середовище для CPB, оброблену LC70 (еквівалентна 1,4 мкг mCry3A/мл живильного середовища) mCry3A щодо CPB, застосовують як паралельний позитивний контроль, щоб підтвердити інсектицидну активність mCry3A. Смертність оцінюється через приблизно 144 і 168 годин. Повний біоаналіз взаємодії з ECB проводять двічі.

[0070] Оцінювання впливу Cry1Ab на токсичність mCry3A: Вплив Cry1Ab на токсичність mCry3A вимірюють шляхом дії CPB першої личинкової стадії LC30 (еквівалентна 0,62 мкг mCry3A/мл живильного середовища) і LC70 (еквівалентна 1,35 мкг mCry3A/мл живильного середовища) концентрацій mCry3A і шляхом порівняння смертності за наявності та відсутності Cry1Ab. Концентрація Cry1Ab становить LC90 для ECB (еквівалентна 142 нг Cry1ab/мл живильного середовища). Число повторних обробок і аналізу даних CPB про смертність є такими самими, як описано вище.

[0071] Біоаналіз взаємодії здійснюють із застосуванням тих самих культуральних методик і умов, описаних вище, за винятком того, що 24-лункові культуральні планшети застосовують в трьох повторностях для кожної обробки. Кожен планшет для обробки містить 24 личинки, в цілому 72 личинки на обробку. Як контролі личинки піддають дії живильного середовища для комах без тестованої речовини (живильне середовище окремо), живильного середовища для комах, обробленого тим самим об'ємом води MilliQ, яку використовують при вживанні розчину тестованої речовини в живильному середовищі окремо, живильного середовища, обробленого розчином термоінактивованого Cry1Ab (30 хвилин при 100 °C) в концентрації, еквівалентній найвищій концентрації mCry3A (5 мкг mCry3A/мл живильного середовища), вживаною в біоаналізі, і Cry1Ab в дозі 142 нг/мл живильного середовища відповідної LC90 Cry1Ab щодо ECB. Живильне середовище для ECB, обробленого концентрацією LC70 (еквівалентна 70 нг Cry1Ab/мл живильного середовища) Cry1Ab щодо ECB, застосовують як паралельний позитивний контроль, щоб підтвердити інсектицидну активність Cry1Ab, вживаного в комбінаторному біоаналізі. Смертність оцінюється приблизно через 72 і 96 годин. Повний біоаналіз взаємодії з ECB проводять двічі.

[0072] Статистичні способи: у кожному дослідженні декілька критеріїв повинні відповідати експериментальній схемі й аналізу даних, описаних нижче, щоб бути достовірним і ефективним тестом на взаємодію між білками: (1) відсутній вплив буфера, вживаного для розчинення білків; (2) відсутній вплив додавання білка per se; або (3) "речовина, що не належить до токсину", не є токсичною для нечутливих до біоаналізу видів у концентраціях, вживаних у даному експерименті. Ці критерії відповідають експериментам як з ECB, так і з CPB.

[0073] Як тільки спостерігають смертність у біоаналізі, смертність документують щодня доти, доки смертність не становить приблизно 30 % при обробці LC30 і 70 % при обробці LC70. Дані з кожного збору проб у межах дослідження взаємодії з кожним білком аналізують окремо. При кожному зборі зразків окремі аналізи здійснюють для кожного аналізу окремо і для зведених даних від обох аналізів.

[0074] При кожному зборі зразків у кожному біоаналізі проаналізована відповідь являє собою долю з перетворенням арксинуса квадратного кореня мертвих личинок у кожній повторності. Впливи різних обробок тестують за допомогою дисперсійного аналізу. Для обох експериментів (з ECB і CPB) два аналізи аналізують окремо і спільно (якщо застосовно). Найважливіше припущення дисперсійного аналізу є таким, що існує гомогенність дисперсії між обробками, а залишки нормально розподіляються. Малоймовірно, що це дійсно, якщо включені обробки негативного контролю, оскільки доля мертвих личинок дорівнює нулю в багатьох повторностях. Це є окремою проблемою для дисперсійного аналізу за даними з перетворенням арксинуса квадратного кореня. Таким чином, дані негативного контролю виключають з аналізу, оскільки їх

підтвердження з припущень способу є очевидним без статистичного аналізу. Для аналізів, проаналізованих окремо, здійснюють дисперсійний аналіз з впливом на обробку. Критерій Льовена (SAS, 2002-2003) застосовують, щоб перевірити припущення про гомогенність дисперсії в межах кожної з чотирьох обробок, а критерій Шапіро-Уїлка (SAS, 2002-2003) застосовують, щоб перевірити припущення про нормально розподілені залишки. Для аналізу спільних аналізів здійснюють дисперсійний аналіз з впливом на аналіз і обробку. Критерій Шапіро-Уїлка застосовують, щоб перевірити припущення про нормально розподілені залишки. Жодного формального тестування припущення про гомогенність дисперсії не здійснюють, оскільки критерій Льовена не можна застосовувати, якщо наявний більш ніж один вплив у дисперсійному аналізі (SAS, 2002-2003). Проте візуальне порівняння графіків з даними щодо перетворення арксинуса квадратного кореня застосовують, щоб підтвердити, що гомогенність дисперсійного припущення була дійсною для зведених даних.

[0075] Факторна структура обробок дає можливість досліджувати три впливи: (1) основний вплив токсичного білка (Чи впливає концентрація токсину на відповідь?); (2) основний вплив нетоксичного білка (Чи впливає наявність речовини, що не належить до токсину, на відповідь?), і (3) взаємодія між концентрацією токсину та наявністю речовини, що не належить до токсину (Чи залежить вплив речовини, що не належить до токсину, від концентрації токсину, і чи залежить вплив концентрації токсину від наявності речовини, що не належить до токсину?).

[0076] Впливи досліджують шляхом складання порівняльних комбінацій умов, що фокусується на даному впливі при видаленні інших впливів. Це досягається за допомогою вивчення відповідних комбінацій середніх значень обробки (комбінація середніх значень обробки відома як порівняння). Кожне порівняння являє собою суму окремих коефіцієнтів порівняння, помноженою на пов'язані з ними середні значення обробки. Статистичну значущість кожного порівняння можна оцінити при відповідній нульовій гіпотезі. Нульова гіпотеза для трьох пунктів полягає в такому: (1) Але: відповідь при низьких і високих концентраціях токсичного білка є тою самою; (2) Але: відповідь є тою самою з або без нетоксичного білка; і (3) Але: будь-які впливи токсичних і нетоксичних білків діють незалежно один від одного.

[0077] Кожне порівняння розраховують при величині помилки першого роду 5 % із застосуванням оцінки помилки з дисперсійного аналізу. При порівнянні 2 комбінацій умов тестують, чи наявний синергізм (або антагонізм) між двома білками. Таким чином, якщо нульова гіпотеза для порівняння 2 відхиляється, тоді дані забезпечують докази синергізму (або антагонізму). Додаткове вивчення знаку будь-яких значних порівнянь визначає, чи наявний синергізм або антагонізм (наприклад, значення позитивного порівняння 2 вказує на більшу смертність, коли наявний нетоксичний білок, отже, синергізм).

[0078] Середні значення та стандартні відхилення комбінаторних біоаналізів розраховують із застосуванням Microsoft Excel®.

РЕЗУЛЬТАТИ

[0079] Оцінювання LC30, LC70 і LC90 для Cry1Ab щодо ECB: біоактивність, оцінена для Cry1Ab щодо личинки кукурудзяного метелика, показала LC30 приблизно 27, LC70 приблизно 70 і LC90 приблизно 142 нг Cry1Ab/мл живильного середовища через 144 години. Живильні середовища негативного контролю показали лише низьку смертність з 8 % для обробки окремо живильним середовищем, 4 % для обробленого буфером живильного середовища і 4 % для живильного середовища, обробленого інактивованим Cry1Ab.

[0080] Оцінювання LC30, LC70 і LC90 для mCry3A щодо CPB: біоактивність, оцінена для mCry3A щодо личинки колорадського жука, показала LC30 приблизно 0,6, LC70 приблизно 1,4 і LC90 приблизно 2,4 мкг mCry3A/мл живильного середовища після 96 годин. Живильні середовища негативного контролю не показали або показали лише низьку смертність з 0 % для обробки окремо живильним середовищем, 8 % для обробленого водою живильного середовища і 4 % для живильного середовища, обробленого інактивованим mCry3A.

[0081] Оцінювання впливу mCry3A на токсичність Cry1Ab: була наявна низька середня смертність (7 % або нижче) на живильному середовищі окремо, на обробленому буфером живильному середовищі, на обробленому термоінактивованим Cry1Ab живильному середовищі, і живильному середовищі, обробленого mCry3A при LC90 для CPB (2,4 мкг mCry3A/мл живильного середовища), через 168 годин. Додатково була очевидною різниця між обробленими токсином живильними середовищами і живильними середовищами негативного контролю. Таким чином, декілька необхідних умов, застосовних для експериментальної схеми, було продемонстровано.

[0082] У обох аналізах через 144 години рівні смертності при обробках LC30 і LC70 (як з, так і без mCry3A) були статистично значимо нижче 30 % і 70 %, відповідно. Таким чином, аналізи продовжували для досягнення необхідних граничних значень токсичності в експерименті. Через

168 годин граничні значення (тобто, відповідно, 30 % і 70 % смертності при обробках LC30 Cry1Ab окремо і LC70 Cry1Ab окремо) були досягнуті. Вважалося, що дані через 144 години мали здатність для виявлення впливів mCry3A на Cry1ab.

[0083] Результати за звідними даними продемонстрували, що впливи концентрації Cry1Ab і наявності mCry3A були незалежними через 144 години і 168 годин ($p > 0,05$) щодо кукурудзяного метелика. Таким чином, вплив концентрації Cry1Ab можна протестувати за допомогою спільного аналізу даних з і без mCry3A. Так само вплив mCry3A можна протестувати за допомогою спільного аналізу даних для LC30 і LC70.

[0084] У зведених даних був наявний статистично значущий вплив концентрації Cry1Ab ($p < 0,05$). Через 144 години і через 168 годин вплив концентрації Cry1Ab був статистично значущим у зведених даних. Ці дані вказують на те, що ECB відповідав, як і очікувалося, на різні концентрації Cry1Ab.

[0085] У зведених даних жодного статистично значущого впливу mCry3A на токсичність Cry1Ab виявлено не було через 144 години або через 168 годин ($p > 0,05$). Оскільки жодного впливу mCry3A окремо на ECB виявлено не було в даному дослідженні, ці результати не забезпечують доказів щодо взаємодії між Cry1Ab і mCry3A при знищенні або боротьбі з кукурудзяним метеликом.

[0086] Оцінювання впливу Cry1Ab на токсичність mCry3A: щодо CPB аналізів була наявна низька середня смертність (4 % або нижче) на живильному середовищі окремо, на живильному середовищі, обробленому водою, на живильному середовищі, обробленому термоінактивованим Cry1Ab, і живильному середовищі, обробленому Cry1Ab при LC90 для ECB (142 нг Cry1Ab/мл живильного середовища), через 96 годин. Додатково була наявна очевидна різниця між живильними середовищами, обробленими токсином, і живильними середовищами негативного контролю. Таким чином, декілька необхідних умов, застосовних для експериментальної схеми, було продемонстровано.

[0087] У обох біоаналізах CPB спостерігали деяку смертність через 72 години; проте рівні смертності при обробках LC30 і LC70 були статистично значно нижчі 30 % і 70 %, відповідно, щонайменше в одному біоаналізі. Таким чином, аналізи продовжували для досягнення необхідних граничних значень токсичності в експерименті. Через 96 годин граничні значення (тобто відповідно 30 % і 70 % смертності при LC30 mCry3A окремо і LC70 mCry3A окремо) були досягнуті. Вважалося, що дані через 72 години мали здатність для виявлення впливів mCry3A на Cry1Ab. Щодо окремих аналізів і зведених даних критерії нормальності й однорідності дисперсії були відповідними як через 72 години, так і 96 годин.

[0088] У зведених даних впливу концентрації mCry3A і наявності Cry1Ab були незалежними через 72 години і 96 годин ($p > 0,05$). Таким чином, вплив концентрації mCry3A можна протестувати за допомогою спільного аналізу даних з і без Cry1Ab. Так само вплив Cry1Ab можна протестувати за допомогою спільного аналізу даних для LC30 і LC70.

[0089] У зведених даних був наявний статистично значущий вплив концентрації mCry3A через 72 години і 96 годин ($p < 0,05$). Ці дані вказують на те, що CPB відповідав, як і очікувалося, на різні концентрації mCry3A.

[0090] У зведених даних жодного статистично значущого впливу Cry1Ab на токсичність mCry3A виявлено не було через 96 годин ($p > 0,05$). Проте у зведених даних через 72 години статистично значущий вплив Cry1Ab був виявлений ($p < 0,05$). Таким чином, взаємодія між mCry3A і Cry1Ab була відмічена через 72 години у зведених даних. Більша смертність за наявності Cry1Ab вказує на те, що впливом є синергізм (як визначено Tabashnik, 1992) або потенціація (як визначено Haghdoost et al., 1997). Таким чином, Cry1Ab потенціює або піддає синергізму активність mCry3A, примушуючи mCry3A працювати швидше щодо цільових твердокрилих комах, чим можна було б очікувати з mCry3A окремо. У промислових масштабах швидше знищення зумовлює менше пошкодження рослин і меншу можливість для розвитку стійкості у твердокрилих комах-шкідників.

Приклад 2. Взаємодія між токсинами щодо кукурудзяного кореневого черв'яка.

[0091] У даному прикладі досліджується, чи існує взаємодія щодо інсектицидної активності між сумішшю активного щодо лускокрилих білка, яка включає Cry1Ab і Vip3Aa20 ("Lep-композиція"), і сумішшю активного щодо твердокрилих білка, яка включає mCry3A ("Col-композиція").

[0092] Впливи Lep - композиції на чутливі види шкідника – кукурудзяного метелика (Ostrinia nubilalis; ECB) досліджують за наявності або у відсутності Col - композиції. Личинки першої личинкової стадії застосовують для проведення біоаналізу поглинання живильного середовища ECB. Відсоток смертності ECB оцінюється через 120 годин після зараження. Спочатку створюють криву залежності "доза-відповідь" для ECB з вісьма концентраціями Lep-композиції.

Дві дози, дозу 1 для ECB і дозу 2 для ECB, Lep-композиції, що дають проміжний рівень відповіді, вибирають з кривої залежності "доза-відповідь" для проведення біоаналізу взаємодії активного щодо лускокрилих і активного щодо твердокрилих білків. Доза 1 для ECB містить приблизно 25 нг Cry1Ab і приблизно 12,5 нг Vip3Aa20 на мл живильного середовища, а доза 2 для ECB містить приблизно 50 нг Cry1Ab і приблизно 25 нг Vip3Aa20 на мл живильного середовища. Таким чином, доза 2 для ECB має приблизно 2X кількість Cry1Ab і білка Vip3Aa20 щодо дози 1 для ECB.

[0093] Результати біоаналізу для ECB показані в таблиці 1. Жодного статистично значущого збільшення відсотка смертності для ECB виявлено не було, коли наявна доза 2 Col-композиції для WCR, вказуючи на те, що відсутня взаємодія між Col-композицією, що містить mCry3A, і Lep-композицією, що містить Cry1Ab+Vip3Aa20, на основі біоаналізу для ECB.

Таблиця 1

Результати біоаналізу для ECB

Обробка	Відсоток смертності ECB
Доза 1 для ECB	21
Доза 1 для ECB + доза 2 для WCR	22
Доза 2 для ECB	36
Доза 2 для ECB + доза 2 для WCR	40
Доза 2 для WCR	4
Lep-буфер (негативний контроль)	1
Lep+Col-буфер (негативний контроль)	4

[0094] Впливи Col-композиції на види чутливого шкідника – західного кукурудзяного кореневого черв'яка (WCR, Diabrotica virgifera) досліджують за наявності або за відсутності Lep-композиції. Личинки першої личинкової стадії застосовують для проведення біоаналізу поглинання живильного середовища WCR. Відсоток смертності WCR оцінюється через 120 годин після зараження. Спочатку створюють криву залежності "доза-відповідь" для WCR з вісьма концентраціями Col-композиції. Дві дози, дозу 1 для WCR і дозу 2 для WCR, Col-композиції, що дають проміжний рівень відповіді, вибирають з кривої залежності "доза-відповідь" для проведення біоаналізу взаємодії Lep-композиції та Col-композиції. Доза 1 для WCR містить приблизно 50 мкг mCry3A на мл живильного середовища, а доза 2 для WCR містить приблизно 200 мкг mCry3A на мл живильного середовища. Таким чином, доза 2 для WCR має приблизно 4X кількість білка mCry3A щодо дози 1 для WCR.

[0095] Результати біоаналізу для WCB показані в таблиці 2. Результати вказують на вищий відсоток смертності WCR, коли наявна доза 2 Lep-композиції, що містить Cry1Ab+Vip3Aa20, вказуючи на те, що комбінація Lep-композиції та Col-композиції знищує WCR більшою мірою, чим можна було б очікувати за рахунок Col-композиції самої по собі.

Таблиця 2

Результати біоаналізу для WCR

Обробка	Відсоток смертності WCR
Доза 1 для WCR	17
Доза 1 для WCR + доза 2 для ECB	46
Доза 2 для WCR	48
Доза 2 для WCR + доза 2 для ECB	65
Доза 2 для ECB	1

Таблиця 2

Результати біоаналізу для WCR

Обробка	Відсоток смертності WCR
Col-буфер (негативний контроль)	1
Col+Lep-буфер (негативний контроль)	1

[0096] Слід розуміти, що приклади і варіанти здійснення, описані в даному документі, призначені лише для ілюстративних цілей, і що різні модифікації або зміни з урахуванням даного опису рекомендуються фахівцеві в даному рівні техніки і мають бути включені в межах суті і змісту даної заявки і обсягу формули винаходу, що додається.

[0097] Усі публікації і заявки на патент, згадані в даному описі, є показником рівня компетенції фахівців у даній галузі техніки, до якої даний винахід належить. Усі публікації та заявки на патент, включені в даний документ за допомогою посилання тією самою мірою, якби кожна окрема публікація або заявка на патент була специфічно і окремо включена за допомогою посилання.

Джерела інформації:

Haghdoost, N.R., Newman, L.M. and Johnson, E.M. (1997) Multiple chemical exposures: synergism vs. individual exposure levels. Reproductive Toxicology 11: 9-27.

MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, FJ., Fischoff, D.A. and Fuchs, R.L. (1990) Specificity and efficacy of purified Bacillus thuringiensis proteins against agronomically important insects. Journal of Invertebrate Pathology 56: 258-266.

SAS Software, Version 9.1 °F the SAS System for Windows. Copyright (C) 2002-2003 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks of SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

Tabashnik, B. (1992) Evaluation of synergism among Bacillus thuringiensis toxins. Applied and Environmental Microbiology 58: 3343-3346.

Tajima, 0., Schoen, E.D., Feron, VJ. and Groten, J.P. (2002) Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of Fusarium mycotoxins for possible interactions. Food and Chemical Toxicology 40: 685-695.

US EPA (1992) EPA Probit Analysis Program version 1.5. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб контролю над твердокрилими комахами-шкідниками, який включає доставку твердокрилому шкіднику або в його довкілля композиції, що містить щонайменше один активний щодо твердокрилих білок і щонайменше один активний щодо лускокрилих білок, де композиція контролює твердокрилого шкідника більшою мірою, ніж можна було б очікувати за рахунок будь-якого окремого активного щодо твердокрилих білка, включеного в дану композицію окремо, де активний щодо твердокрилих білок являє собою модифікований Cry3A-білок, і де активний щодо лускокрилих білок являє собою білок Cry1Ab.

2. Спосіб за п. 1, де твердокрилий шкідник являє собою колорадського жука або кукурудзяного кореневого черв'яка.

3. Спосіб за п. 2, де кукурудзяного кореневого черв'яка вибирають з групи, що включає західного кукурудзяного кореневого черв'яка, північного кукурудзяного кореневого черв'яка, південного кукурудзяного кореневого черв'яка і мексиканського кукурудзяного кореневого черв'яка.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, де композиція містить трансгенну рослину, яка експресує активний щодо твердокрилих білок і активний щодо лускокрилих білок.

5. Спосіб за п. 4, де трансгенна рослина являє собою трансгенну кукурудзу.

6. Спосіб за п. 5, де трансгенна кукурудза являє собою селекційний гібрид, що включає трансгенні події кукурудзи MIR604 і Bt11.

7. Спосіб за п. 6, де трансгенна кукурудза додатково включає трансгенну подію кукурудзи MIR162.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, де твердокрилою комахою є шкідник - кукурудзяний кореневий черв'як, і де зазначений спосіб включає доставку шкіднику - кукурудзяному кореневому черв'яку - або в його довкілля композиції, що містить модифікований білок Cry3A (mCry3A) і білок Cry1Ab, де композиція контролює шкідника - кукурудзяного кореневого черв'яка - більшою мірою, ніж можна було б очікувати за рахунок білка mCry3A окремо.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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