

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045758**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890696

(22) Дата подачи заявки
2016.09.08

(54) ВАРИАНТЫ ГФПД И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **15184866.0**

(56) WO-A1-2009144079
WO-A1-2014043435

(32) **2015.09.11**

(33) **EP**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/EP2016/071159**

(87) **WO 2017/042259 2017.03.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАСФ АГРИКАЛЧЕРАЛ
СОЛЮШНС СИД ЮС ЛЛК (US)**

(72) Изобретатель:
**Линка Марк (DE), Поре Фабьен (FR),
Лабер Бернд, Ланге Гудрун, Теббе Ян,
Коко Уэйн, Штрерат Михаэль, Вебер
Эрнст, Павловски Николаус, Геске
Зандра, Бальфен-Росс Хайке, Вобст
Нина, Тис Кристина (DE), Дьюбалд
Мэньюзл (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В изобретении описаны полипептиды ГФПД и содержащие их растения, проявляющие полную устойчивость к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД, принадлежащих к различным химическим классам. Разработан набор мутантных полипептидов ГФПД, которые не обладают или обладают только существенно сниженной аффинностью с гербицидами, ингибирующими ГФПД, и в то же самое время скорость диссоциации ингибиторов ГФПД мутантного полипептида ГФПД повышена до такой степени, что ингибиторы ГФПД больше не действуют как медленно связывающие или медленно, прочно связывающие ингибиторы, а вместо этого стали полностью обратимыми ингибиторами. В частности, обеспечены выделенные полинуклеотиды, кодирующие мутантные полипептиды ГФПД, придающие устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, которые принадлежат к различным химическим классам. Дополнительно охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие полинуклеотидам.

B1**045758****045758****B1**

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к молекулярной биологии растений, в частности к новым полипептидам ГФПД, которые придают улучшенную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Предпосылки создания изобретения

4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (ГФПДы) представляют собой ферменты, катализирующие реакцию превращения пара-гидроксифенилпирувата (в данном описании сокращенно как ГФП), продукта распада тирозина, в гомогентизат (в данном описании сокращенно как ГГ), предшественник токоферола и пластохинона в растениях (Crouch N.P. et al. (1997), *Tetrahedron*, 53, 20, 6993-7010, Fritze et al. (2004), *Plant Physiology* 134:1388-1400). Токоферол действует в качестве мембраноассоциированного антиоксиданта. Пластохинон, во-первых, действует как переносчик электронов между PSII и комплексом цитохром b6/f, и во-вторых, является редокс-кофактором фитоендесатуразы, участвующей в биосинтезе каротиноидов.

До настоящего времени более 1000 последовательностей нуклеиновых кислот из различных организмов, которые присутствуют в базе данных NCBI, были аннотированы как кодирующие предполагаемый белок с доменом ГФПД. Однако для большинства из них не было доказано того, что белок будет обладать ферментативной активностью ГФПД, ни в ходе анализа *in vitro*, ни в подходе *in planta*, также как и того, что такой белок ГФПД может придавать гербицидную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД при экспрессии в растении. Некоторые белки ГФПД и их первичные последовательности были описаны в предшествующем уровне техники, в частности белки ГФПД бактерий, таких как *Pseudomonas* (Ruetschi et al., *Eur. J. Biochem.*, 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), *Kordia* (WO 2011/076889) *Synechococcus* (WO 2011/076877), *Acidobacterium* и *Mucilaginibacter* (WO 2015/022634), *Rhodococcus* (WO 2011/076892), протист, таких как *Blepharisma* (WO 2011/076882), эуриархеот, таких как *Picrophilus* (WO 2011/076885), водорослей, таких как *Chlamydomonas reinhardtii* (ES 2275365; WO 2011145015), *Scenedesmus* (WO 2015/022634), растений, таких как *Arabidopsis* (WO 96/38567, GENBANK® AF047834), морковь (WO 96/38567, GENBANK® 87257), *Avena sativa* (WO 2002/046387, WO 2011/068567), пшеница (WO 2002/046387), *Brachiaria platyphylla* (WO 2002/046387), *Cenchrus echinatus* (WO 2002/046387), *Lolium rigidum* (WO 2002/046387), *Festuca arundinacea* (WO 2002/046387), *Setaria faberi* (WO 2002/046387), *Eleusine indica* (WO 2002/046387), *Sorghum* (WO 2002/046387, WO 2012021785), кукуруза (WO 2012/021785), *Cortis japonica* (WO 2006/132270), *Lemna* (WO 2015/022634), или млекопитающих, таких как мышь или свинья, или грибов, таких как *Coccicoides* (GENBANK® COITRP).

Ингибирование ГФПД приводит к разъединению фотосинтеза, недостаточности вспомогательных светособирающих пигментов и, что важнее всего, деструкции хлорофилла УФ излучением и активными формами кислорода (обесцвечивание) из-за недостатка фотозащиты, в норме обеспечиваемой каротиноидами (Nottis и др. (1995), *Plant Cell* 7: 2139-2149). Обесцвечивание фотосинтетически активных тканей приводит к ингибированию роста и гибели растения.

Некоторые молекулы, ингибирующие ГФПД (в дальнейшем именуются как гербициды, ингибирующие ГФПД), и которые ингибируют превращение ГФП в ГГ, несмотря на специфическое связывание с ферментом, оказались очень эффективными гербицидами.

В настоящее время большинство коммерчески доступных гербицидов, ингибирующих ГФПД принадлежат к одному из следующих, перечисленных ниже химических семейств:

1) трикетоны, например, бензобциклонон [т.е. 3-[2-хлор-4-(метилсульфонил)бензоил]-4-(фенилсульфонил)бицикло[3.2.1]окт-3-ен-2-он]; сулькотрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)бензоил]-1,3-циклогександион], мезотрион [т.е. 2-[4-(метилсульфонил)-2-нитробензоил]-1,3-циклогександион] (в данном описании сокращенно как MST); темботрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)-3-[(2,2,2-трифторэтокси)метил]бензоил]-1,3-циклогександион]; тефурилтрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)-3-[[тетрагидро-2-фуранил]метокси]метил]бензоил]-1,3-циклогександион]; бициклопирон [т.е. 4-гидрокси-3-[[2-[(2-метоксиэтокси)метил]-6-(трифторметил)-3-пиридинил]карбонил]бицикло[3.2.1]окт-3-ен-2-он]; фенквинотрион [т.е. 2-[[8-хлор-3,4-дигидро-4-(4-метоксифенил)-3-оксо-2-квиноксалинил]карбонил]-1,3-циклогександион], и, как описано в WO 2007088876, WO 2009016841, WO 2010089993, WO 2010116122, WO 2012002096, WO 201131658, WO 2012136703, JP 2013040141, WO 2013080484, WO 2014014904, WO 2014031971, US 20140106968;

2) дикетонитрилы, например, 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-дион и 2-циано-1-[4-(метилсульфонил)-2-трифторметилфенил]-3-(1-метилциклопропил)пропан-1,3-дион;

3) изоказолы, например, изокафлутол [т.е. (5-циклопропил-4-изоказоллил)[2-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)фенил]метанон]. В растениях, изокафлутол (в данном описании сокращенно как IFT) быстро метаболизируется до DKN, дикетонитрильного соединения, проявляющего свойства ингибитора ГФПД;

4) гидроксипиразолы, например, пиразоксифен [т.е. 2-[[4-(2,4-дихлорбензоил)-1,3-диметил-1Н-пиразол-5-ил]окси]-1-фенилэтанон]; бензофенап [т.е. 2-[[4-(2,4-дихлор-3-метилбензоил)-1,3-диметил-1Н-пиразол-5-ил]окси]-1-(4-метилфенил)этанон]; пиразолинат [т.е. (2,4-дихлорфенил)[1,3-диметил-5-[[4-

метилфенил)сульфонил]окси]-1Н-пиразол-4-ил]метанон]; пирасульфотол [т.е. (5-гидрокси-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-ил)[2-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)фенил]метанон]; топрамезон [т.е. [3-(4,5-дигидро-3-изоксазол-2-метил-4-(метилсульфонил)фенил)(5-гидрокси-1-метил-1Н-пиразол-4-ил)метанон]; толпиралат [т.е. 1-[[1-этил-4-[3-(2-метоксиэтокси)-2-метил-4-(метилсульфонил)бензоил]-1Н-пиразол-5-ил]окси]этил-метил-карбонат];

5) N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, как описано в WO 2011035874 и WO 2012123416, WO 2012123409, EP 2562174, WO 2013064459, WO 2013087577, WO 2013124238, WO 2013124228, WO 2013164333, WO 2013037342, WO 2014053473, WO 2014086737, WO 2015007662, WO 2015007632, WO 2015007633 и, как описано в WO 2013072300, WO 2013072402, WO 2013072450, WO 2014184014, WO 2014184019, WO 2014184058, WO 2014192936, WO 2015052152, WO 2015052178 и N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды, как описано в WO 2012126932 и EP 2562174, WO 2013064459, WO 2013087577, WO 2013124238, WO 2013124228, WO 2013124245, WO 2013164333, WO 2013037342, WO 20141053473, WO 2014086737, WO 2015007662, WO 2015007632, WO 2015007633; например, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"); 2-хлор-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид; 2-хлор-3-(этилсульфонил)-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-4-(трифторметил)бензамид;

6) N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды, как описано в WO 2012028579 и WO 2012123409, WO 2013017559, EP 2562174, WO 2013064459, WO 2013064457, WO 2013087577, WO 2013104705, WO 2013124238, WO 2013124228, WO 2013124245, WO 2013164331, WO 2013164333, WO 2013174843, WO 2013037342, WO 2014053473, WO 2014086737, WO 2015007662, WO 2015007632, WO 2015007633; например, 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид; 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид и, как описано в WO 2013072528, WO 2013076315, WO 2013076316, WO 2013083859, WO 2013092834, WO 2013139760, WO 2013144231, WO 2014126070, WO 2014135654, WO 2014184015, WO 2014184016, WO 2014184017, WO 2014184073, WO 2014184074, WO 2014192936, WO 2015022284, WO 2015052153, WO 2015052173;

7) производные пиридазинона, как описано в WO 2013050421 и WO 2013083774, WO 2014154828, WO 2014154882;

8) производные оксопразина, как описано в WO 2013054495;

9) N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, как описано в WO 2013144234, WO 2015007564;

10) триазины, как описано в WO 2014154829; и

11) пиразолоны, как описано в EP 2881387 и EP 2881388.

Эти гербициды, ингибирующие ГФПД, могут быть применены против злаковых и/или широколистных сорных трав в полях с сельскохозяйственными растениями, которые проявляют метаболическую устойчивость, такими как маис (*Zea mays*), рис (*Oryza Sativa*) и пшеница (*Triticum aestivum*), в которых они быстро разлагаются (Schulz et al. (1993), FEBS letters, 318, 162-166; Mitchell et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 120-128; Garcia et al. (2000), Biochem., 39, 7501-7507; Pallett et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 133-142). С целью расширить спектр применения этих гербицидов, ингибирующих ГФПД, были предприняты некоторые усилия для придания растениям, в частности, растениям без или с недостаточной метаболической устойчивостью, уровня устойчивости, приемлемого в полевых агрономических условиях.

За исключением попытки обхода опосредованной ГФПД выработки гомогентизата (US 6,812,010), была осуществлена сверхэкспрессия чувствительного фермента с целью выработать в растении количества целевого фермента, достаточные в отношении гербицида (WO96/38567). Сверхэкспрессия полипептидов ГФПД приводила к лучшей довосходовой устойчивости к производному дикетонитрила (в данном описании сокращенно как DKN) - IFT, но уровень устойчивости был недостаточным для возникновения устойчивости при послевосходовой обработке (Matringe et al. (2005), Pest Management Science 61: 269-276).

Третья стратегия заключалась в том, чтобы мутировать ГФПД таким образом, чтобы получить целевой фермент, который наряду с сохранением его свойств катализировать превращение ГФП в ГГ, является менее чувствительным к ингибиторам ГФПД, чем природный полипептид ГФПД до мутации.

Эту стратегию успешно применяли в производстве растений, устойчивых к 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-диону и к 2-циано-1-[4-(метилсульфонил)-2-трифторметилфенил]-3-(1-метилциклопропил)пропан-1,3-диону (EP496630), двум гербицидам, ингибирующим ГФПД, принадлежащим к семейству дикетонитрилов (WO99/24585). Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Ile, и в особенности Gly336Trp (положения мутировавших аминокислот указаны со ссылкой на *Pseudomonas fluorescens* дикого типа полипептид ГФПД, соответствующий SEQ ID NO: 1 в соответствии с настоящим изобретением) были идентифицированы как мутации, отвечающие за повышенную устойчивость к обработке этими дикетонитрильными гербицидами.

Совсем недавно введение гена ГФПД *Pseudomonas fluorescens* в пластидный геном табака и соевых

бобов показало большую эффективность, нежели ядерная трансформация, придавая устойчивость при посеве после обработки посредством IFT (Dufourmantel et al. (2007), Plant Biotechnol J.5(1):118-33).

В заявке WO 2004/024928, изобретатели стремились увеличить биосинтез пренилхинона (например, синтез пластохинонов, токоферолов) в клетках растений путем увеличения притока предшественника ГФП в клетки этих растений. Этого достигали путем подсоединения синтеза упомянутого предшественника к "шикиматному" пути через сверхэкспрессию фермента префенатдегидрогеназы (ПДГ). Они также отмечали, что трансформирование растений геном, кодирующим фермент ПДГ и геном, кодирующим фермент ГФПД, делает возможным повышение устойчивости упомянутых растений к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

В заявке WO 2009/144079 раскрыты последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих гидроксибензилпируватдиоксигеназу (ГФПД) с конкретными мутациями в положении 336 белка ГФПД *Pseudomonas fluorescens* и их применение для получения растений, устойчивых к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

В заявке WO 2002/046387 были идентифицированы несколько доменов полипептидов ГФПД, происходящих из растений, которые могут быть существенными для придания устойчивости к различным гербицидам, ингибирующим ГФПД, но не представлены ни данные *in planta*, ни биохимические данные, подтверждающие воздействие описанных функций доменов.

В заявке WO 2008/150473 была приведена в пример комбинация из двух отличающихся механизмов устойчивости - модифицированного гена *Avena sativa*, кодирующего мутантный фермент ГФПД и монооксигеназы кукурузы CYP450 (ген *nsf1*) - с целью получить улучшенную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, но не были раскрыты данные, демонстрирующие синергетические эффекты, основывающиеся на комбинации обоих белков.

Кроме того, раскрыт способ создания растений, устойчивых к гербицидам, ингибирующим ГФПД, путем сверхэкспрессии не только гена, кодирующего устойчивую ГФПД, как например, из *Avena sativa* (US 2011/0173718) или *Agabidopsis* (WO 2013/064964, WO 014/177999), а также в комбинации с некоторыми генами растений, кодирующими белок HST (гомогентизатсоланезилтрансфераза). Тем не менее, уровень устойчивости к некоторым избранным гербицидам, ингибирующим ГФПД был довольно ограниченным.

В заявках WO 2011/094199 и US2011/0185444 была оценена устойчивость нескольких сотен линий соевых бобов дикого типа к ингибитору ГФПД - IFT.

Очень мало линий показывали необходимый уровень устойчивости к гербицидам. Был идентифицирован предполагаемый QTL (локус количественных признаков), отвечающий за устойчивость. На этом участке генома в качестве основного признака, отвечающего за улучшенную устойчивость к гербициду, ингибирующему ГФПД был идентифицирован ген, кодирующий транспортер ABC. Однако трансгенные растения, экспрессирующие идентифицированные гены, не показывали никакого улучшения устойчивости к протестируемым гербицидам, ингибирующим ГФПД.

В заявках WO 2010/085705 и US 2014/0053295 раскрыты некоторые мутанты полипептида ГФПД *Avena sativa*. В заявке WO 2010/085705 было показано, что некоторые из вариантов проявляли улучшенную устойчивость *in vitro* к трикетону "Мезотрион" (в данном описании сокращенно как MST), тем не менее, только незначительное количество мутантов были экспрессированы в растениях табака. Кроме того, ни одно из растений табака, экспрессирующих эти мутанты, не проявляло повышенной устойчивости к MST или IFT, по сравнению с растениями табака, экспрессирующими ген ГФПД дикого типа *Avena sativa*. В заявке US 2014/0053295 описано, что немного мутантов ГФПД *Avena sativa* были экспрессированы в растениях соевых бобов и обладали хорошим уровнем устойчивости к MST, как известно из растений, экспрессирующих ген ГФПД *Avena sativa* дикого типа. Тем не менее, другие гербициды, такие как темботрион или IFT индуцировали значительно более высокое повреждение листьев в этих растениях соевых бобов.

В US 2012/0042413 описаны мутантные полипептиды ГФПД маиса, обладающие активностью ГФПД, а также демонстрирующие определенную нечувствительность к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ГФПД и кроме того, предложен определенный набор мутаций в разных положениях полипептидов ГФПД и в конце концов раскрыты биохимические данные, а также уровни устойчивости растений, содержащих некоторые из таких мутировавших полипептидов ГФПД. В EP 2453012 были описаны некоторые мутанты полипептидов ГФПД; тем не менее, не представлена повышенная устойчивость описанных мутантов *in planta* к некоторым гербицидам, ингибирующим ГФПД.

В заявке WO 2014/043435 были описаны молекулы рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды ГФПД *Pseudomonas* spp., состоящие из аминокислотной последовательности, включающей пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1; или пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1 и триптофан в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1; или серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, треонин в аминокислотном положении, соответствующем

аминокислотному положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; или триптофан в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 188 SEQ ID NO: 1 и триптофан в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1; или пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и глутаминовая кислота в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; или пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, триптофан в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, аланин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1.

Описанные в настоящее время и частично запущенные в продажу гербициды, ингибирующие ГФПД, действуют как медленно связывающие или медленно, прочно связывающие ингибиторы (см. Morrison (1982) Trends Biochem. Sci. 7, 102-105). Эти ингибиторы связываются медленно (т.е., с небольшой скоростью ассоциации, k_{on}), но не ковалентно с полипептидом ГФПД (т.е. они производят зависящее от времени ингибирование), и высвобождаются очень медленно (т.е. с исключительно низкой скоростью диссоциации, k_{off}) вследствие их чрезвычайно сильного взаимодействия с ферментом.

Эти ингибиторы связываются настолько сильно, что становятся возможными стехиометрические титрования с ферментом.

Все в большей степени становится очевидным то, что медленно связывающие или медленно, прочно связывающие ингибиторы являются не только исключительно сильными ингибиторами ГФПД, но также имеют признаки, делающие их привлекательными агрохимическими веществами для борьбы с сорными травами. Медленная скорость диссоциации усиливает эффективность ингибитора до такой степени, что в идеальном случае достаточно всего одной молекулы ингибитора на активный сайт полипептида ГФПД для полного ингибирования его активности и сохранения этого уровня ингибирования в течение длительного периода времени даже при отсутствии свободных молекул ингибитора в растительной клетке. Это обуславливает низкие нормы применения этих ингибиторов, необходимые для борьбы с нежелательными сорными травами на площадях возделывания сельскохозяйственных культур.

Свойства медленно связывающих или медленно, прочно связывающих ингибиторов имеют преимущество в том случае, когда целью являются достижение ингибирования ГФПД и гербицидная активность. Тем не менее, эти же свойства являются большим недостатком в случае, когда необходимо создать полипептиды ГФПД, устойчивые к этим ингибиторам.

Мутации в полипептиде ГФПД, которые только снижают аффинность ингибитора к ферменту (k_i) не могут полностью преодолеть ингибирование ГФПД, поскольку все еще может иметь место связывание ингибитора и ингибирование полипептида ГФПД, поэтому, достигнутый уровень ингибирования будет поддерживаться в течение долгого периода времени, даже при отсутствии свободного ингибитора в растительной клетке. Кроме того, частично коммерчески доступные гербициды, ингибирующие ГФПД, принадлежат к структурно отличающимся химическим классам, таким как трикетоны, дикетонитрилы, изоксазолы, гидроксипиразолы, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды, N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды, производные пиридазиона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил), триазины и пиразолы. Существующие в настоящее время, описанные в уровне техники полипептиды ГФПД демонстрируют довольно узкий диапазон устойчивости к структурно отличающимся гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Благодаря приведенным выше кинетическим свойствам всех описанных в настоящее время и частично имеющихся в продаже гербицидов, ингибирующих ГФПД, до сегодняшнего дня не были обнаружены растения, устойчивые к гербицидам, ингибирующим ГФПД с полной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД, несмотря на многочисленные усилия по их созданию.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описаны полипептиды ГФПД и содержащие их растения, проявляющие полную устойчивость к одному или большому количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД, принадлежащие к разным химическим классам. Оказалось, что для создания таких полипептидов ГФПД с повышенной до максимума и широкой устойчивостью к некоторым классам гербицидов, ингибирующих ГФПД, важно снизить аффинность к полипептиду ГФПД (k_i), относительно соответствующего(их) гербицидов, ингибирующих ГФПД и одновременно обеспечить более высокую скорость диссоциации (k_{off}) медленно связывающего или медленно, прочно связывающего ингибитора, как известно из полипептидов ГФПД дикого типа и некоторых мутантных полипептидов ГФПД, чтобы достичь высокого уровня устойчивости ингибитора.

В настоящем изобретении эта задача была решена при помощи разработки набора полипептидов ГФПД, которые либо не имеют, либо имеют только существенно сниженную аффинность к гербицидам, ингибирующим ГФПД и, в то же время, скорость диссоциации гербицидов, ингибирующих ГФПД увеличивается до такой степени, что гербициды, ингибирующие ГФПД больше не действуют как медленно

связывающие или медленно, прочно связывающие ингибиторы, а вместо этого становятся полностью обратимыми ингибиторами.

В настоящем изобретении предлагаются композиции и способы получения нового набора полипептидов ГФПД, обладающие указанными выше характеристиками (т.е. не имеют или имеют только существенно сниженную аффинность к гербицидам, ингибирующим ГФПД, повышенную скорость диссоциации гербицидов, ингибирующих ГФПД фермента; гербициды, ингибирующие ГФПД больше не действуют как медленно связывающие или медленно, прочно связывающие ингибиторы, а вместо этого становятся полностью обратимыми ингибиторами). Композиции включают полипептиды ГФПД и выделенные, рекомбинантные или химерные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие такие полипептиды ГФПД, векторы и клетки-хозяева, содержащие эти молекулы нуклеиновых кислот. Композиции также включают антитела к этим полипептидам. Нуклеотидные последовательности могут быть использованы в конструкциях ДНК или экспрессионных кассетах для трансформации и экспрессии в организмах, включая микроорганизмы и растения. Нуклеотидные последовательности могут быть синтетическими последовательностями, разработанными для экспрессии в организме, включая, но не ограничиваясь ими, микроорганизм или растение.

Композиции содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих гербицидные устойчивые полипептиды ГФПД, включая молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид ГФПД, содержащий (а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и (в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и, необязательно, одну или несколько дополнительных аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотным положениям 204, 213, 264, 268, 270, 310, 315, 330, 331, 338, 339, 340, 344, 345 SEQ ID NO: 1, включая полипептиды ГФПД, изложенные в любой из SEQ ID NO: 3-108, а также его фрагменты.

Композиции также содержат трансформированные растения, растительные клетки, ткани и семена, устойчивые к гербицидам-ингибиторам ГФПД благодаря введению последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с изобретением в геном растений, растительных клеток, тканей и семян. Введение последовательности позволяет применять гербициды, ингибирующие ГФПД на растения для селективного уничтожения чувствительных к ингибитору ГФПД сорных трав или других нетрансформированных растений, а не трансформированного организма. Последовательности могут также быть использованы в качестве маркера для селекции растительных клеток, выращиваемых в присутствии одного или большего количества гербицидов, ингибирующих ГФПД.

Дополнительно предлагаются способы идентификации полипептидов ГФПД с активностью гербицидной устойчивости к ингибитору ГФПД.

Композиции и способы в соответствии с изобретением пригодны для создания организмов с усиленной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД. Эти организмы и композиции, содержащие организмы пригодны для сельскохозяйственных целей. Растения или семена, содержащие последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением могут быть выращены в поле и собраны для получения растительного продукта. Композиции в соответствии с изобретением также применимы для выявления присутствия устойчивых к гербицидам, ингибирующим ГФПД, полипептидов или нуклеиновых кислот в продуктах или организмах.

Короткое описание фигур

На фиг. 1 представлена упрощенная схема связанного анализа активности ГФПД, применяемого в настоящем изобретении для определения ферментативной активности примерных полипептидов ГФПД.

На фиг. 2 представлены примерные кинетические изменения поглощения при 320 нм (Abs320) в образцах необработанных экстрактов полипептида ГФПД дикого типа и нокаутного, наблюдаемого с 200 мкМ ГФП и 0, 4 или 13 мкМ соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) в соответствии с примером 3 в связанном анализе активности ГФПД. Нокаутный полипептид ГФПД получали путем замены гистидина на аланин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 162 SEQ ID NO: 1. Это положение хорошо известно своей важностью из-за его участия в координированном связывании атома железа в активном участке полипептида ГФПД (Serre et al. (1999), Structure, 7, 977-988).

На фиг. 3 представлены примерные кинетические изменения поглощения при 320 нм (Abs320) очищенного мутантного полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 17 в соответствии с примером 3, наблюдаемого при высокой концентрации субстрата и с 0, 48, 240 или 1200 мкМ соед. 2 (2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид) в связанном анализе активности ГФПД. Видимую кинетическую константу (k_{app}) определяли как изменение сигнала во времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) с ограниченным временным интервалом.

На фиг. 4 изображены данные из примерного определения k_i с очищенным мутантным полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO: 17, с различными концентрациями ингибитора и субстрата (ГФП) путем подгонки в соответствии с моделью конкурентного ингибирования:

а) кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) в при-

сутствии 0 - 0.0012 М Соед. 2 при заданной концентрации субстрата, в соответствии с примером 3;

б) кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) в присутствии 0 - 0.0012 М Соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) при заданной концентрации субстрата, в соответствии с примером 3;

в) кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) в присутствии 0 - 0.0012 М MST при заданной концентрации субстрата, в соответствии с примером 3;

г) кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) в присутствии 0 - 0.0012 М DKN при заданной концентрации субстрата, в соответствии с примером 3.

Все примерные полипептиды ГФПД, которые приведены в табл. 2, 3, 4, и 5 были измерены и проанализированы, как показано, например, с SEQ ID NO: 17 на фиг. 3 и 4.

Подробное описание изобретения

В дальнейшем настоящее изобретение будет описано более полно со ссылками на сопроводительные фигуры, на которых представлены некоторые, но не все варианты осуществления изобретения. Несомненно, эти изобретения могут быть осуществлены во многих различных формах и не должны быть истолкованы как ограничивающиеся вариантами, приведенными в настоящем изобретении; вернее, эти варианты осуществления представлены таким образом, чтобы это раскрытие удовлетворяло применимым требованиям закона. Одни и те же номерные обозначения обозначают одни и те же элементы по всему описанию.

Многие модификации и другие варианты осуществления изобретений, изложенные в настоящем документе, могут прийти в голову специалисту в данной области техники, к которой относятся эти изобретения, обладая преимуществом в отношении идей, представленных в вышеприведенных описаниях и приложенных чертежах. Поэтому следует понимать, что изобретения не должны ограничиваться раскрытыми конкретными вариантами осуществления, и что модификации и другие варианты осуществления предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в настоящем изобретении использованы конкретные термины, их применяют только в общем и описательном смысле, а не с целью ограничения.

Обзор.

Было предпринято несколько попыток для придания растениям агрономически приемлемого уровня устойчивости к широкому спектру гербицидов, ингибирующих ГФПД, включая обход ГФПД опосредованной выработки гомогентизата (US 6,812,010), сверхэкспрессию чувствительного фермента с целью произвести в растении достаточное количество целевого фермента по отношению к гербициду (WO 96/38567), и мутацию ГФПД, чтобы получить целевой фермент, который при сохранении его свойств катализировать превращение ГФП в гомогентизат, является менее чувствительным к ингибиторам ГФПД, чем природная ГФПД до мутации.

Несмотря на эти успехи, полученные для разработки растений, проявляющих устойчивость к нескольким описанным выше гербицидам, ингибирующим ГФПД, все же необходимо разработать и/или улучшить устойчивость растений к более новым или к нескольким различным гербицидам, ингибирующим ГФПД, принадлежащим к различным химическим классам, в особенности к гербицидам, ингибирующим ГФПД, принадлежащим к таким классам как трикетоны (например, бензобиклон, сулькотрион мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (например, изоксафлутол), гидроксипиразолы (например, пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (например, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (например, 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид); 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопрозина, трикетоны, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолы.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает улучшенные композиции и способы, регулирующие гербицидную устойчивость к ингибитору ГФПД. Гербициды, ингибирующие ГФПД, такие как гербициды из класса трикетонов (например, бензобиклон, сулькотрион мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (например, изоксафлутол), гидроксипиразолы (например, пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (например, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (например, 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид); 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, произ-

водные пиридазинона, производные оксоприазина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолоны обладают превосходной гербицидной эффективностью против широкого спектра экономически значимых однодольных и двудольных однолетних сорных трав. Активные вещества также обладают хорошей способностью подавлять многолетние вредные растения, с которыми трудно бороться и которые распространяются из корневищ, корневых стержней или других многолетних органов. В рамках настоящего изобретения под понятием "гербицид" следует понимать как гербицидно активное вещество само по себе или такое вещество, которое объединено с добавкой, изменяющей ее эффективность, такой как, например, повышающий его активность агент (синергетический агент), или ограничивающий его активность агент (сафенер). Гербицид также может содержать твердые или жидкие адьюванты или носители, обычно используемые в технологии приготовления (например, природные или регенерированные минеральные вещества, растворители, диспергаторы, смачивающие агенты, агенты для придания клейкости, эмульгаторы, агенты усиления роста и т.п.), а также один или большее количество других гербицидов и/или один или большее количество пестицидов (например, инсектицидов, вируцидов, микробицидов, амeboцидов, пестицидов, фунгицидов, бактерицидов, нематоцидов, моллюскоцидов и т.п.).

Способы включают трансформирование организмов нуклеотидными последовательностями, кодирующими ген устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД в соответствии с изобретением или введение иным образом таких генов устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД в не содержащих их организмы (например, спариванием, слиянием клеток, или скрещиванием организмов, содержащих введенный ген устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД в соответствии с изобретением с не содержащими его организмами и получением потомства, содержащего такой ген). Нуклеотидные последовательности в соответствии с изобретением пригодны для получения растений, проявляющих повышенную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, в частности повышенную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД из такого класса, как трикетоны (предпочтительно бензобизиклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, или фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, или толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксоприазина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолоны.

Экспрессия гена устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД в соответствии с изобретением может также привести к устойчивости в отношении "гербицидов производных кумарона" (описано в WO 2009/090401, WO 2009/090402, WO 2008/071918, WO 2008/009908). В этой связи, любой из генов устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД в соответствии с изобретением может также быть экспрессирован в растении, также экспрессирующем химерный ген гомогентизатсоланезилтрансферазы (HST) или ген мутированной HST, как описано в WO 2011/145015, WO 2013/064987, WO 2013/064964, или WO 2010/029311, для получения растений, устойчивых к гербицидам, ингибирующим HST. Как применяют в настоящем описании "гербицид производное кумарона" или "гербицид, ингибирующий HST" охватывает соединения, которые подпадают под номенклатуру ИЮПАК 5Н-тиопирано[4,3-*b*]пиридин-8-ол, 5Н-тиопирано[3,4-*b*]пиразин-8-ол, оксатиино[5,6-*b*]пиридин-4-ол, и оксатиино [5,6-*b*]пиразин-4-ол.

Таким образом, под геном "устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД" в соответствии с изобретением следует понимать ген, кодирующий полипептид, который придает клетке или организму способность переносить более высокие концентрации гербицида, ингибирующего ГФПД, чем такая же клетка или организм, которые не экспрессируют белок, или же переносить некоторую концентрацию гербицида, ингибирующего ГФПД в течение более длительного периода времени, чем такая же клетка или организм, которые не экспрессируют белок, или же который придает клетке или организму способность осуществлять фотосинтез, расти и/или размножаться с меньшим повреждением или ингибированием роста, нежели наблюдаемые у такой же клетки или организма, которые не экспрессируют подобный белок.

"Полипептид устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД" включает полипептид, который придает клетке или организму способность переносить более высокие концентрации гербицидов, ингибирующих ГФПД, чем такая же клетка или организм, которые не экспрессируют белок, или же переносить некоторую концентрацию гербицидов, ингибирующих ГФПД в течение более длительного периода времени, чем такая же клетка или организм, которые не экспрессируют полипептид, или же который придает клетке или организму способность осуществлять фотосинтез, расти и/или размножаться с меньшим повреждением или ингибированием роста, чем наблюдаемые у такой же клетки или организма, которые не экспрессируют подобный полипептид.

Термин "полипептид" включает в себя белки, такие как ферменты, антитела и полипептиды средней длины и короткие пептиды вплоть до длины аминокислотной последовательности ниже десяти.

Термин "фермент" в настоящем изобретении означает любой полипептид, катализирующий реакцию, в которой пара-гидроксифенилпируват превращается в гомогентизат. Он включает в себя природные ферменты, а также варианты ферментов и их производные. Он также содержит любой фрагмент такого фермента, а также варианты, спроектированные путем вставки, делеции, рекомбинации и/или любого другого метода, что приводит к ферментам, которые отличаются своей аминокислотной последовательностью с природным ферментом или вариантами фермента. Он также содержит молекулы белка с посттрансляционными и/или химическими модификациями, например, гликозилирование, гамма-карбоксихлорирование и ацелирование, любой молекулярный комплекс или слитый белок, содержащий один из вышеупомянутых белков.

Термины "вариант полипептида" или "мутантный полипептид" означают любую молекулу полипептида, полученную мутагенезом, предпочтительно путем сайт-направленного или случайного мутагенеза с измененной аминокислотной последовательностью по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа. Под понятиями "переносить", "устойчивость" или "резистентный" следует понимать или способность выдержать конкретное применение гербицида, ингибирующего ГФПД, или способность осуществлять основные клеточные функции, такие как фотосинтез, синтез белка или дыхание и размножение таким способом, который явно не отличается от необработанных клеток или организмов, или же способность не иметь значительной разницы в урожайности или даже иметь улучшенную урожайность у растений, обработанных гербицидом, ингибирующим ГФПД по сравнению с такими же растениями, необработанными таким же гербицидом (но где сорные травы были удалены или предотвращены механизмом, отличающимся от применения гербицида, ингибирующего ГФПД, как например, способами, описанными в заявке WO 2011/100302, которая включена в данное описание во всей своей полноте путем ссылки).

Кроме придания клетке устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД, последовательности нуклеиновых кислот ГФПД в соответствии с изобретением кодируют полипептиды, обладающие активностью ГФПД, т.е. катализирующие реакцию, в которой пара-гидроксифенилпируват (ГФП) превращается в гомогентизат. Каталитическая активность полипептида ГФПД может быть определена различными известными в данной области методами. В заявках WO 2009/144079 и WO 2014/043435 описаны различные пригодные методы скрининга.

Ферментативная активность полипептидов ГФПД может быть измерена любым методом, позволяющим или определить уменьшение количества субстратов ГФП или O₂, или измерить накопление любых продуктов, полученных из ферментативной реакции, т.е. гомогентизат или CO₂. В частности, активность ГФПД может быть измерена посредством метода, описанного в WO 2009/144079; Garcia et al. (1997), *Biochem. J.* 325, 761-769; Garcia et al. (1999), *Plant Physiol.* 119, 1507-1516; или в WO 2012/021785, которые включены в данное описание во всей своей полноте путем ссылки.

Для целей настоящего изобретения "эталонный" полипептид ГФПД (или ген ГФПД, кодирующий такой полипептид) представляет собой любой полипептид ГФПД или нуклеиновую кислоту, с которыми сравнивают полипептид ГФПД или нуклеиновую кислоту ГФПД в соответствии с изобретением. В целях описания полипептиды ГФПД в соответствии с настоящим изобретением, термины "белок" и "полипептид" применяют взаимозаменяемо. Этот эталонный полипептид ГФПД может быть природной растительной, бактериальной или животной ГФПД, или может представлять собой мутировавший полипептид ГФПД, известный из уровня техники, как например, мутанты PfP215L и PfG336F, Публикации международной заявки WO 2009/144079, или же может быть любым из белков PfHPPDevo33, PfHPPDevo36, PfHPPDevo37, PfHPPDevo40, или PfHPPDevo41 из заявки WO 2014/043435; PfHPPDevo41 изложен в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 2. Такой эталонный полипептид ГФПД можно применять для определения того, обладает ли полипептид или нуклеиновая кислота ГФПД в соответствии с изобретением особым соответствующим свойством (например, улучшенной, сравнимой или сниженной устойчивостью к гербициду, ингибирующему ГФПД или ферментной активностью полипептида ГФПД; улучшенной, сравнимой или сниженной экспрессией в клетке-хозяине; улучшенной, сравнимой или сниженной стабильностью белка и т.п.).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения гербицидный устойчивый к ингибитору ГФПД полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой (включая его выделенные, рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие их нуклеиновую кислоту, полипептиды ГФПД и композиции, кодируемые нуклеиновой кислотой, а также способы применения полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой для повышения устойчивости растения к гербицидам, ингибирующим ГФПД, в частности повышения устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД из класса трикетонов (предпочтительно бензобикликон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидами, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамидами (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-

(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид), производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолоны) имеет (а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и (в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и, необязательно, одну или несколько дополнительных аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотным положениям 204, 213, 264, 268, 270, 310, 315, 330, 331, 338, 339, 340, 344, 345 SEQ ID NO: 1, включая белки ГФПД, изложенные в любой SEQ ID NOs:3-108. Под "соответствующим" следует понимать положение нуклеотида или аминокислоты относительно такого положения в SEQ ID NO: 1, когда две (или большее количество) последовательности выравнены с использованием стандартных алгоритмов выравнивания. Термин "положение" в полинуклеотиде или полипептиде относится к конкретным одиночным основаниям или аминокислотам в последовательности полинуклеотида или полипептида соответственно. Термин "сайт" в полинуклеотиде или полипептиде относится к определенному положению или области в последовательности полинуклеотида или полипептида соответственно. Термин "полинуклеотид" соответствует любому генетическому материалу любой длины и любой последовательности, содержащей одноцепочечные и двухцепочечные молекулы ДНК и РНК, включая регуляторные элементы, структурные гены, группы генов, плазмиды, целые геномы и их фрагменты.

В одном варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1,

и где указанный полипептид ГФПД является устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением), являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД, состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1,

и дополнительно содержащей

i) метионин, треонин, серин или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 204 SEQ ID NO: 1; и/или

ii) лизин или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 213 SEQ ID NO: 1; и/или

iii) аргинин, лизин, глутамин, или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 264 SEQ ID NO: 1; и/или

iv) аргинин, глицин или серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин, лейцин, глутаминовую кислоту, пролин или серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1; и/или

vi) серин, гистидин или лизин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 310 SEQ ID NO: 1; и/или

vii) аргинин, метионин или гистидин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 315 SEQ ID NO: 1; и/или

viii) гистидин, аланин, фенилаланин, валин или глицин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 330 SEQ ID NO: 1; и/или

ix) пролин, гистидин, серин, изолейцин или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 331 SEQ ID NO: 1; и/или

x) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 338 SEQ ID NO: 1; и/или

xi) глутаминовую кислоту, аргинин, аланин или треонин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 339 SEQ ID NO: 1; и/или

xii) аргинин, глутамин, метионин, глутаминовую кислоту, глицин, лейцин, или валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; и/или

xiii) глутамин, пролин, или аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 344 SEQ ID NO: 1; и/или

xiv) лизин, аргинин, метионин, аланин или валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(a) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1, и дополнительно содержащей

i) лейцин или лизин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 213 SEQ ID NO: 1; и/или

ii) аргинин или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 264 SEQ ID NO: 1; и/или

iii) аргинин, глицин или серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1; и/или

iv) глутаминовую кислоту или серин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин или метионин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 315 SEQ ID NO: 1; и/или

vi) гистидин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 330 SEQ ID NO: 1; и/или

vii) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 338 SEQ ID NO: 1; и/или

viii) аргинин или валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; и/или

ix) глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 344 SEQ ID NO: 1; и/или

x) лизин, валин или метионин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(a) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1, и дополнительно содержащей

i) лизин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 213 SEQ ID NO: 1; и/или

ii) аргинин или лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 264 SEQ ID NO: 1; и/или

iii) глицин или аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1; и/или

iv) глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 315 SEQ ID NO: 1; и/или

vi) гистидин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 330 SEQ ID NO: 1; и/или

vii) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 338 SEQ ID NO: 1; и/или

viii) аргинин или валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; и/или

ix) глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 344 SEQ ID NO: 1; и/или

x) лизин, валин или метионин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(a) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и дополнительно содержащей

(i) глицин или аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1,

(ii) глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1,

(iii) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; и

(iv) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1,

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(a) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и дополнительно содержащей

(i) лизин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 213 SEQ ID NO: 1,

(ii) глицин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1,

(iii) глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1,

(iv) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1; и

(v) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением), являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД, состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и дополнительно содержащей

(i) лизин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 213 SEQ ID NO: 1,

(ii) лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 264 SEQ ID NO: 1,

(iii) глицин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1,

(iv) глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1,

(v) валин или аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1;

(vi) глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 344 SEQ ID NO: 1, и

(vii) метионин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

(а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1,

(б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

(в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и дополнительно содержащей

(i) лейцин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 264 SEQ ID NO: 1,

(ii) аргинин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 268 SEQ ID NO: 1,

(iii) глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 270 SEQ ID NO: 1,

(iv) аргинин в аминокислотном положении 315, соответствующем аминокислотному положению SEQ ID NO: 1,

(v) валин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1;

(vi) глутамин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 344 SEQ ID NO: 1, и

(vii) метионин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей

а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1, и

б) гистидин в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, или

в) аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, и

г) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) состоит из аминокислотной по-

следовательности, содержащей:

а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1;

б) гистидин в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1 или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1;

в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1; и

г) гистидин в положении, соответствующем аминокислотному положению 330 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей:

а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1;

б) гистидин в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1, или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1;

в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1; и

г) валин в положении, соответствующем аминокислотному положению 340 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, полипептид ГФПД в соответствии с настоящим изобретением (включая кодирующую его нуклеотидную последовательность, и его рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ГФПД в соответствии с изобретением) являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, содержащей:

а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1

б) гистидин в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1 или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1;

в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1; и

г) валин в положении, соответствующем аминокислотному положению 345 SEQ ID NO: 1.

В табл. 1 представлены соответствующие положения аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом ГФПД *Pseudomonas fluorescens* дикого типа (SEQ ID NO: 1), где варианты полипептида ГФПД в соответствии с изобретением содержат три или большее количество аминокислотных замен. Если явно не указано иное, то замены в соответствующих положениях аминокислот всегда относятся к эталонному полипептиду ГФПД *Pseudomonas fluorescens* дикого типа, соответствующему SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Обзор примерных аминокислотных обменов относительно полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 1

Аминокислотное положение относительно SEQ ID NO: 1	Примерные аминокислотные обмены
204	M, T, S, L
213	L, K
264	R, K, Q, L
268	G, S, R
270	R, L, E, P, S
310	S, H, K
315	R, M, H
330	H, A, F, V, G

331	I, H, P, S, L
335	P
336	D, H
337	S
338	V
339	E, R, A, T
340	G, R, E, V, Q, M, L
344	Q, P, R
345	V, K, M, R, A

Аминокислоты упоминаются в настоящем изобретении, используя название аминокислоты, аббревиатуру из трех букв или аббревиатуру с одной буквой. В приведенной ниже таблице указан список стандартных аминокислот вместе с их сокращениями.

Аланин	A	Ala
Цистеин	C	Cys
Аспарагиновая кислота	D	Asp
Глутаминовая кислота	E	Glu
Фенилаланин	F	Phe
Глицин	G	Gly
Гистидин	H	His
Изолейцин	I	Ile
Лизин	K	Lys
Лейцин	L	Leu
Метионин	M	Met
Аспарагин	N	Asn
Пролин	P	Pro
Глутамин	Q	Gln
Аргинин	R	Arg
Серин	S	Ser
Треонин	T	Thr
Валин	V	Val
Триптофан	W	Trp
Тирозин	Y	Tyr
Цистеин	C	Cys

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что генетический код является вырожденным, то есть более чем один триплет кодона может кодировать одну и ту же аминокислоту. Следовательно, представленные здесь аминокислотные последовательности могут быть созданы посредством альтернативных последовательностей, которые используют разные кодоны для кодирования одной и той же аминокислотной последовательности.

В другом варианте осуществления, последовательность полипептидов ГФПД в соответствии с изобретением по меньшей мере на 53%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной здесь как SEQ ID NO: 1.

Примерные последовательности ГФПД, которые могут быть модифицированы в соответствии с настоящим изобретением, включают последовательности от бактерий, в частности, от *Pseudomonas* spp. type, более предпочтительно от *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas testosteroni* (*Comamonas testosteroni*).

Для целей настоящего изобретения, полипептид ГФПД в соответствии с изобретением может также включать другие модификации, например, в которых некоторые аминокислоты (например, аминокислоты 1-17) были заменены, добавлены или удалены в целях клонирования, для создания слияния транзит-

ного пептида, и т.п., который сохраняет активность ГФПД, т.е. способность катализировать превращение пара-гидроксибензилпирувата в гомогентизат, или может быть любым полипептидом ГФПД, который может быть дополнительно улучшен. Например, полипептид ГФПД, который может быть дополнительно улучшен посредством описанных в настоящем изобретении модификаций, может представлять собой вариант ГФПД, полученный из *Pseudomonas fluorescens*, изложенный в данном случае как любые SEQ ID NOs: 3-108.

В предпочтительном варианте осуществления, полипептиды ГФПД в соответствии с настоящим изобретением и являющиеся устойчивыми к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД являются эквивалентными SEQ ID NO: 1 (*Pseudomonas fluorescens*) помимо аминокислот, заменяемых в соответствии с настоящим изобретением, т.е. соответствующий полипептид ГФПД является идентичным SEQ ID NO: 1, но имеющим

- (а) пролин в аминокислотном положении 335 SEQ ID NO: 1,
- (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в аминокислотном положении 336 SEQ ID NO: 1, и
- (в) серин в аминокислотном положении 337 SEQ ID NO: 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления, полипептиды ГФПД в соответствии с настоящим изобретением, являющиеся устойчивыми к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД являются эквивалентными SEQ ID NO: 1 (*Pseudomonas fluorescens*) помимо аминокислот, заменяемых в соответствии с настоящим изобретением, т.е., соответствующий полипептид ГФПД является идентичным SEQ ID NO: 1, но имеет одну или большее количество замен в соответствующем аминокислотном положении согласно приведенной выше табл. 1, при условии, что пролин существует в положении 335 SEQ ID NO: 1, гистидин или аспарагиновая кислота существуют в положении 336 SEQ ID NO: 1, а серин существует в положении 337 SEQ ID NO: 1. В другом предпочтительном варианте осуществления, ГФПД полипептиды в соответствии с настоящим изобретением являющийся устойчивым к одному или большему количеству гербицидов, ингибирующих ГФПД являются эквивалентными SEQ ID NO: 1 (*Pseudomonas fluorescens*) помимо аминокислот, заменяемых в соответствии с настоящим изобретением, т.е., соответствующий полипептид ГФПД является идентичным SEQ ID NO: 1, но имеет аминокислотные замены в соответствующем аминокислотном положении(ях), как определено в табл. 2 (ниже) в строках SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность в соответствии с изобретением (включая ее выделенные, рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие последовательность нуклеиновых кислот, аминокислотные последовательности и их композиции, закодированные последовательностью нуклеиновых кислот, а также способы применения последовательности нуклеиновых кислот для повышения устойчивости растения к гербицидам, ингибирующим ГФПД, в частности, повышения устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД из класса трикетонов (предпочтительно бензобиклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол) гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топраметзон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолон, кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в любом из SEQ ID NOs:3-108, и их фрагменты и варианты, которые кодируют полипептид ГФПД, ингибирующий устойчивость к гербицидам.

А. Способы измерения устойчивости к ингибитору ГФПД.

Для оценки полипептидов ГФПД в соответствии с изобретением может быть использован любой приемлемый метод измерения устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД. Устойчивость может быть измерена путем отслеживания способности клетки или организма преодолеть применение конкретного гербицида, ингибирующего ГФПД, или способности осуществлять важнейшие клеточные функции, такие как фотосинтез, синтез белка, дыхание или размножение таким способом, который явно не отличается от необработанных клеток или организмов, или же способность не иметь значительной разницы в урожайности или даже иметь улучшенную урожайность у растений, обработанных гербицидом, ингибирующим ГФПД по сравнению с такими же растениями, необработанными таким же гербицидом (но где сорные травы были удалены или предотвращены механизмом, отличающимся от применения гербицида, ингибирующего ГФПД). В некоторых вариантах осуществления, устойчивость может быть измерена по видимому индикаторному фенотипу клетки или организма, трансформированного нуклеиновой кислотой, содержащей ген, кодирующий соответствующий полипептид ГФПД, или в анализе *in vitro* полипептида ГФПД, в присутствии разных концентраций различных гербицидов, ингибирующих ГФПД. Реакции

на дозы и относительные сдвиги в реакциях на дозы, связанные с такими индикаторными фенотипами (образование коричневого цвета, ингибирование роста, обесцвечивание, гербицидный эффект и т.д.) для удобства выражены, например, значениями GR50 (концентрация, вызывающая 50% снижение роста) или MIC (минимальная ингибирующая концентрация) где повышение значений соответствует повышению устойчивости, свойственной полипептиду ГФПД, обычным образом, основываясь на повреждении растений, симптомах обесцвечивания меристемы и т.д. в диапазоне различных концентраций гербицидов. Эти данные могут быть выражены, например, значениями GR50, полученными из кривых доза/реакция, где на оси x нанесена "доза" и на оси y нанесены "процент гибели", "гербицидный эффект", "количество взойшедших зеленых растений" и т.д., где повышенные значения GR50 соответствуют повышенным уровням устойчивости, свойственной экспрессированному полипептиду ГФПД. Гербициды могут быть применены пригодным образом до восхода или после восхода растений.

В различных вариантах осуществления, уровень устойчивости нуклеиновой кислоты или гена, кодирующего полипептид ГФПД в соответствии с изобретением или полипептид ГФПД в соответствии с изобретением может быть проверен посредством переноса генов, регенерации, размножения и распылительных тестов исследуемого растения, такого как табак, или сельскохозяйственного растения, такого как соевые бобы, кукуруза или хлопчатник. Согласно результатам такой проверки, подобные растения являются более устойчивыми, преимущественно переносят дозу по меньшей мере в 2 раза больше нормальной дозы, рекомендуемой для применения в поле, еще более предпочтительно переносят дозу до 4-х раз больше нормальной дозы, рекомендуемой для применения в поле, к гербицидам, ингибирующим ГФПД (например, гербициды, ингибирующие ГФПД из класса трикетонов (предпочтительно бензобиклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамида, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамида (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазиноны и пиразолоны, чем такие растения, не содержащие никакого экзогенного гена, кодирующего полипептид ГФПД, или растения, содержащие ген, включающий эталонную ДНК, кодирующую полипептид ГФПД, например, *Pseudomonas fluorescens* ДНК, кодирующую ГФПД, под контролем того же промотора, что и у нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ГФПД, предлагаемый в настоящем изобретении. Соответственно, термин "способный повышать устойчивость растения к по меньшей мере одному гербициду, воздействующему на ГФПД" означает устойчивость растения, экспрессирующего ГФПД в соответствии с изобретением к дозе по меньшей мере в 1, в 2, или в 3, или в 4 или большее количество раз выше нормальной дозы, используемой в полях, гербицида, ингибирующего ГФПД, по сравнению с растением, экспрессирующим только собственную эндогенную ГФПД, или растением, экспрессирующим эталонный полипептид ГФПД. В этом отношении термин "гербицид, воздействующий на ГФПД" не ограничивается веществами, известными и/или используемыми в качестве гербицидов, но относится к любым веществам, ингибирующим каталитическую активность полипептидов ГФПД.

Термин "гербицидная устойчивость", "устойчивость к гербицидам" или "нечувствительность к гербицидам" также означает способность фермента осуществлять свою соответствующую каталитическую реакцию в присутствии ингибитора/гербицида или после воздействия ингибитора/гербицида. Гербицидная устойчивость ферментов, т.е. их способность противодействовать ингибирующему действию гербицида, может быть выражена качественно и количественно. Качественно ферменты, переносящие разные категории или даже разные классы ингибиторов, обладают высокой устойчивостью и наоборот. В количественном выражении устойчивость фермента по сравнению с одним гербицидом может быть выражена как соответствующая "остаточная активность" или "остаточный оборот", наблюдаемая в одном образце этого фермента, рассчитанная как соотношение активности (k_{app} , кинетическая мера) или общий оборот субстрата (изменение сигнала, измерение конечной точки) в отсутствие и в присутствии одного ингибитора (Bergmeyer, H.U.: "Methods of enzymatic analysis", 1974). В различных вариантах осуществления для определения остаточной активности кажущуюся кинетическую константу (k_{app}) определенной конверсии субстрата можно измерить как кинетические изменения поглощения при 320 нм в связанном анализе в том, что гомогенизат (ГГ), образованный посредством ГФПД из ГФП, непосредственно превращается в хорошо поглощающую молекулу малеилацетоацетата (МАО) вторым ферментом гомогенизат-диоксигеназой (HGD), применяемой в избытке постоянно во всех анализах. Соотношение k_{cat}/k_M ферментативной активности пропорционально кажущейся кинетической константе k_{app} и пропорционально $k_{cat}/k_M * [E]$ ($[E]$ = концентрация фермента). Конкурентоспособный ингибитор проявляет кажущееся увеличение k_M и, следовательно, обратное уменьшение k_{app} при не насыщающихся концентрациях субстрата.

Поскольку оба измерения k_{app} в присутствии и в отсутствии ингибитора осуществляют с использованием идентичного образца фермента, сырого или очищенного, и таким образом, при той же концентрации фермента, концентрация фермента исключается из расчета остаточной активности и соотношения обоих k_{app} непосредственно указывает на изменение k_M вследствие ингибирования. Примечательно, что это понятие относится к парам фермент/ингибитор, взаимодействующим с "конкурентным ингибированием", вероятно правильным для почти всех вариантов полипептидов и описанных ингибиторов. Константа ингибирования k_i для фермента и соответствующего ингибитора описывает прочность связывания ингибитора с этим ферментом. Повышенная устойчивость дается для соотношений 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 или выше и по сравнению с эталонной последовательностью ГФПД в присутствии или в отсутствии любого соответствующего гербицида, ингибирующего ГФПД.

Специальным, хотя и не ограничивающим, типом анализа, который может быть использован для оценки последовательностей полипептида ГФПД в соответствии с изобретением является колориметрический анализ (как описано, например, см. US 6,768,044). В этом анализе, например, клетки *E. coli*, содержащие вектор pSE420-HPPDx (HPPDx означает любой ген, кодирующий предполагаемый ГФПД полипептид; основной вектор "pSE420" получали от Invitrogen Карлсруе, Германия) или модифицированную версию pSE420 (pSE420(RI)NX)-HPPDx производят растворимые меланиноподобные пигменты из катаболизма тирозина, когда сверхэкспрессированный полипептид ГФПД является активным. Эти меланиноподобные пигменты анализируют в жидкой культуре или путем нанесения культуры *E. coli* на твердый агар типа LB-бульона. После от 16 часов до 8 дней при 20-30°C, культуральную среду или агаровые лунки, которые были инокулированы культурой *E. coli*, содержащей пустой вектор pSE420, не изменяют цвет среды или те, которые были высеваны с помощью культуры *E. coli*, содержащей вектор pSE420-HPPDx, содержащий ген, кодирующий неактивную ГФПД, также не изменяет цвет среды, в то время как лунки, инокулированные культурой *E. coli*, содержащей вектор pSE420-HPPDx, кодирующий активную ГФПД, являются коричневыми. В присутствии гербицида, ингибирующего ГФПД, эта выработка пигмента может быть ингибирована, и культура не будет изменять цвет среды, если не экспрессируется и не активен полипептид ГФПД, устойчивый к гербициду, ингибирующему. Ранее было продемонстрировано, что этот тест отражает активность ГФПД и устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, независимо от происхождения этой активности, и позволяет идентифицировать активность ГФПД (US 6,768,044), т.е. на качественном уровне.

В. Способы введения мутаций в последовательности ГФПД.

В мутировавших полипептидах ГФПД, кодируемых нуклеиновой кислотой в соответствии с изобретением по меньшей мере три аминокислоты были заменены как определено выше.

Замена может быть осуществлена в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эталонный полипептид ГФПД, как определено выше, любыми средствами, пригодными для замены, в указанной последовательности, кодон, который кодирует подлежащую замене аминокислоту кодоном, который соответствует аминокислоте, которая должна заменить его, причем указанные кодоны широко описаны в литературных источниках и хорошо известны специалисту в данной области.

Для достижения этой замены могут быть использованы несколько способов молекулярной биологии. Пригодный способ получения мутированной последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением и соответствующего белка включает осуществление сайт-направленного мутагенеза на кодонах, кодирующих одну или большее количество заранее выбранных аминокислот. Способы получения таких сайт-направленных мутаций хорошо известны специалисту и широко описаны в литературных источниках (в частности: Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, Edited by M.J. McPHERSON, IRL PRESS), или являются способами, для которых возможно использовать коммерческие наборы (например, набор для мутагенеза QUIKCHANGE^{ff} lightening от Qiagen или Stratagene). После сайт-направленного мутагенеза является приемлемым отобрать клетки, содержащие мутировавшую ГФПД, которая менее чувствительна к ингибитору ГФПД с помощью соответствующего скринингового средства. Соответствующие методы скрининга для достижения этого были описаны выше.

Альтернативно, последовательность ДНК, кодирующая эталонный полипептид ГФПД, может быть модифицирована *in silico* для кодирования полипептида ГФПД, имеющего одну или несколько замен, перечисленных в настоящем изобретении, и затем синтезирована *de novo*. Этот способ также хорошо известен в уровне техники, описан в литературных источниках. Нуклеотидная последовательность, кодирующая мутировавший полипептид ГФПД, может быть введена в клетку-хозяина, как описано в другом месте настоящего изобретения.

С. Выделенные полинуклеотиды и их варианты и фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды. Термин "полинуклеотид" соответствует любому генетическому материалу любой длины и любой последовательности, содержащей одноцепочечные и двухцепочечные молекулы ДНК и РНК, включая регуляторные элементы, структурные гены, группы генов, плазмиды, целые геномы и их фрагменты. "Рекомбинантный" полинуклеотид или полипептид/белок, или его биологически активная часть, как определено в настоящем изобретении, больше не присутствует в его первоначальном, родном организме, например, когда он содержится в гетерологичной клетке-хозяине или в трансгенной

растительной клетке, семени или растении. В одном варианте осуществления, рекомбинантный полинуклеотид не содержит последовательностей (например, кодирующих белок или регуляторных последовательностей), которые естественно фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, расположенных на 5' и 3' концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Термин "рекомбинантный" охватывает полинуклеотиды или полипептиды, с которыми производили манипуляции по отношению к природному полинуклеотиду или полипептиду, так что полинуклеотид или полипептид отличается (например, в химическом составе или структуре) от встречающегося в природе. В другом варианте осуществления, "рекомбинантный" полинуклеотид не содержит внутренние последовательности (т.е. интроны), которые встречаются в природе в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Типичным примером такого полинуклеотида является так называемая комплементарная ДНК (кДНК). Например, в различных вариантах осуществления, выделенный полинуклеотид, кодирующий устойчивость к гербициду, ингибирующему ГФПД, может содержать менее чем 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, или 0.1 kb нуклеотидной последовательности, которая природным образом фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид. Молекулы нуклеиновых кислот в соответствии с изобретением включают те, которые кодируют ГФПД в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением функционально связана с промотором, способным направлять экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине (например, растительной клетке-хозяине или бактериальной клетке-хозяине).

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены примерные варианты и фрагменты любой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности, изложенные в любой из SEQ ID NOs: 3-108. "Фрагмент" полинуклеотида может кодировать биологически активную часть полипептида, или же это может быть фрагмент, который можно использовать как гибридизационный зонд или ПЦР-праймер, применяя способы, раскрытые в другом месте настоящего изобретения. Полинуклеотиды, являющиеся фрагментами полинуклеотида, включают по меньшей мере около 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 смежных нуклеотидов, или же до количества нуклеотидов, присутствующего в описанном здесь полноразмерном полинуклеотиде, в зависимости от предполагаемого назначения (например, описанная в данном изобретении нуклеиновая кислота ГФПД). Под "смежными" нуклеотидами следует понимать остатки нуклеотидов, расположенные непосредственно рядом друг с другом.

Фрагменты полинуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением, как правило, будут кодировать фрагменты полипептида, которые сохраняют биологическую активность полноразмерного белка устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД; т.е., активность устойчивости к гербициду. Под "сохранением активности устойчивости к гербицидам" следует понимать, что фрагмент будет иметь по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 95, 100, 110, 125, 150, 175, 200, 250%, по меньшей мере приблизительно 300% или более активности устойчивости к гербицидам полноразмерного белка устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД, изложенного здесь как SEQ ID NOs: 3-108. Методы измерения активности устойчивости к гербицидам хорошо известны в уровне техники и примерные способы описаны в настоящем изобретении. В неограничивающем примере фрагмент в соответствии с изобретением будет устойчивым к той же дозе гербицида, ингибирующего ГФПД, или устойчивым к 1x, 2x, 3x, 4x или еще более высокой дозе гербицида, ингибирующего ГФПД, или фрагменты будут такими же самыми или более устойчивыми на основании K_i между фрагментом и SEQ ID NOs: 3-108.

Фрагмент полинуклеотида, который кодирует биологически активную часть полипептида в соответствии с изобретением, будет кодировать по меньшей мере приблизительно 150, 175, 200, 250, 300, 350 смежных аминокислот, или до общего количества присутствующих аминокислот в полноразмерном полипептиде в соответствии с изобретением. В неограничивающем примере фрагмент полинуклеотида, который кодирует биологически активную часть полипептида ГФПД имеет (а) пролин в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 335 SEQ ID NO: 1 и (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем аминокислотному положению 336 SEQ ID NO: 1 и (в) серин в положении, соответствующем аминокислотному положению 337 SEQ ID NO: 1 и, необязательно, одну или несколько дополнительных аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотным положениям 204, 213, 264, 268, 270, 310, 315, 330, 331, 338, 339, 340, 344, 345 SEQ ID NO: 1, включая белок ГФПД, изложенный в любой из SEQ ID NOs: 3-108.

Изобретение также охватывает варианты полинуклеотидов, как описано выше. "Варианты" полинуклеотида также включают те последовательности, которые кодируют ГФПД в соответствии с изобретением, однако консервативно отличающиеся по причине вырождения генетического кода, а также те, которые являются достаточно идентичными. Варианты в соответствии с настоящим изобретением будут сохранять активность полипептида ГФПД и устойчивость к гербициду, ингибирующему ГФПД. Термин "достаточно идентичные" означает полипептид или полинуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере приблизительно 53%, по меньшей мере приблизительно 60 или 65% идентичности последовательности, приблизительно 70 или 75% идентичности последовательности, приблизительно

но 80 или 85% идентичности последовательности, приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, используя одну из программ выравнивания с применением стандартных параметров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения могут быть приемлемым образом отрегулированы для определения соответствующей идентичности полипептидов, кодируемых двумя полинуклеотидами, принимая во внимание вырождение кодонов, сходство аминокислот, положение рамки считывания и т.п.

Бактериальные гены очень часто обладают многочисленными инициаторными кодонами метионина близко от начала открытой рамки считывания. Часто инициация трансляции на одном или более из этих стартовых кодонов приводит к образованию функционального белка. Такие стартовые кодоны могут включать кодоны ATG. Тем не менее, бактерии, такие как *Bacillus* sp. также распознают кодон GTG в качестве стартового кодона, и белки, иницирующие трансляцию на кодонах GTG, содержат метионин как первую аминокислоту. Более того, часто априори нельзя определить, какой из этих кодонов естественным образом используется в бактерии. Таким образом, следует понимать, что использование одного из альтернативных кодонов метионина может привести к созданию вариантов, придающих устойчивость к гербицидам. Эти белки устойчивости к гербицидам охватываются настоящим изобретением и могут быть использованы в способах в соответствии с настоящим изобретением. Встречающиеся в природе аллельные варианты могут быть определены с помощью хорошо известных техник молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методики гибридизации, как указано ниже. Вариантные полинуклеотиды также включают полинуклеотиды синтетического происхождения, образованные, к примеру, с использованием сайт-направленных или других стратегий мутагенеза, но которые все еще кодируют полипептид, обладающий необходимой биологической активностью.

Кроме того, специалист в данной области будет понимать, что изменения могут быть введены путем дальнейшей мутации полинуклеотидов в соответствии с изобретением, таким образом, приводя к дальнейшим изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых полипептидов, без изменения биологической активности полипептидов. Таким образом, варианты выделенных полинуклеотидов могут быть созданы введением одного или большего количества дополнительных нуклеотидных замещений, добавлений или делеций в соответствующий полинуклеотид, кодирующий ГФПД в соответствии с изобретением, так что в кодируемый полипептид вводят 3-5, 1-7, 1-9, 1-11, 1-13, 1-15, или 1-17 аминокислотных замещений, добавлений или делеций, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 аминокислотных замещений, добавлений или делеций. Другие мутации могут быть введены стандартными техниками, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, или техниками генной перестановки. Такие варианты полинуклеотидов также охватываются изобретением.

Варианты полинуклеотидов могут быть созданы введением мутаций в случайном порядке по всей кодирующей последовательности или ее части, таким как насыщающий мутагенез или перестановочный мутагенез, и полученные в результате мутанты могут быть подвергнуты скринингу на способность придавать активность устойчивости к гербицидам для выявления мутантов, сохраняющих активность.

Дополнительные способы образования вариантов включают в себя подвергание клетки, экспрессирующей описанный в настоящем изобретении белок (или их библиотеку) специальным условиям, создающим нагрузку на активность белка. Специальные условия могут включать (но не ограничиваются ими) изменения температуры, изменения pH, изменения концентраций субстратов или ингибиторов и изменения в буферной композиции или их концентраций. Библиотека белков может быть подвергнута этим условиям во время экспрессии белка (например, в *E. coli* или другом хозяине) или же после создания белкового экстракта, или после очистки белка.

Функциональная или ферментативная активность библиотеки белков, подвергнутой стрессовым условиям, затем может быть сравнена с эталонным белком для выявления белков с улучшенными свойствами. Это сравнение активностей можно осуществлять как часть скрининга роста или альтернативно как часть ферментативного анализа, количественно определяющего активность белка. Свойства, которые могут быть определены как улучшенные, могут включать устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, изменения в кинетических константах (включая K_M , K_i , k_{cat}), стабильность белка, термостабильность белка, или оптимальное значение температуры и pH для белка.

D. Выделенные белки и их варианты и фрагменты.

Полипептиды устойчивости к гербицидам также охватываются настоящим изобретением. Полипептид устойчивости к гербицидам включает препараты полипептидов, содержащие менее чем приблизительно 30, 20, 10 или 5% (по сухому весу) полипептида неустойчивости к гербицидам (здесь и далее также обозначается "загрязняющий белок"). В рамках настоящего изобретения "белок устойчивости к гербицидам" означает описанный в настоящем изобретении полипептид ГФПД. Также обеспечены его фрагменты, биологически активные части и варианты, которые могут быть использованы в практическом осуществлении способов согласно настоящему изобретению.

"Фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептида, содержащие часть аминокислотной последовательности, кодирующую белок устойчивости к гербицидам и сохраняющую активность устойчивости к гербицидам. Биологически активная часть белка устойчивости к гербицидам может быть полипептидом длиной, например, в 10, 25, 50, 100 или более аминокислот. По-

добные биологически активные части могут быть получены при помощи техник рекомбинации и оценены на активность устойчивости к гербицидам.

Под "вариантами" следует понимать белки или полипептиды, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере приблизительно на 53, 60, 65%, приблизительно 70, 75%, приблизительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из примерных SEQ ID NOs: 3-108, при этом указанный вариант обладает активностью полипептида ГФПД и устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения могут быть пригодным образом отрегулированы для определения соответствующей идентичности полипептидов, кодируемых двумя полинуклеотидами, принимая во внимание вырождение кодонов, схожесть аминокислот, положение рамки считывания и т.п.

Например, консервативные замещения аминокислот могут быть сделаны в одном или нескольких заменимых остатках аминокислот. "Заменяемый" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который может быть изменен в эталонной последовательности полипептида без изменения биологической активности, в то время как "незаменяемый" аминокислотный остаток необходим для биологической активности. "Консервативное замещение аминокислоты" представляет собой замещение, при котором аминокислотный остаток замещают остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислот со сходными боковыми цепями определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Замещения аминокислот могут быть сделаны на неконсервативных участках, сохраняющих свою функцию. Как правило, подобные замещения не делают для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков внутри консервативного мотива, когда такие остатки являются незаменимыми для активности полипептида. Тем не менее, специалисту в данной области будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения в консервативных остатках.

В настоящее изобретение также включены антитела к ГФПД в соответствии с настоящим изобретением, или к ее вариантам или фрагментам. Способы получения антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Патент США № 4,196,265).

Таким образом, один из аспектов в соответствии с изобретением относится к антителам, одноцепочечным антигенсвязывающим молекулам или другим белкам, специфически связывающимся с одной или несколькими молекулами белка или пептида в соответствии с изобретением и их гомологами, химерами или фрагментами. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с белком, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NOs: 1-108 или его фрагментом.

Антитела в соответствии с изобретением могут быть использованы для количественного или качественного определения молекул пептида или белка в соответствии с изобретением, или же для выявления посттрансляционных модификаций белков. Как применяют в настоящем изобретении, антитело или пептид считается "специфически связывающимся" с молекулой белка или пептида в соответствии с изобретением, если такое связывание конкурентно не ингибируется присутствием неродственных молекул.

Е. Накопление генов.

В коммерческом производстве сельскохозяйственных культур желательно уничтожить нежелательные растения (т.е. "сорные травы") с полей сельскохозяйственных растений путем надежного пестицидного регулирования. Идеальной обработкой стала бы такая, которую можно было бы применить ко всему полю, но которая уничтожала бы только нежелательные растения, не оказывая влияния на культурные растения. Одна из подобных систем обработки включает использование устойчивых к гербицидам сельскохозяйственных растений, так что при распылении гербицида над полем устойчивых к гербицидам культур они продолжают расти, в то время как неустойчивые к гербициду сорные травы гибнут или серьезно повреждаются. В идеале подобные системы обработки должны пользоваться преимуществом варьирования свойств гербицидов, так что борьба с сорными травами была бы наилучшей из возможных комбинаций гибкости и экономии. Например, отдельные гербициды имеют разный период действия в полевых условиях, и некоторые гербициды сохраняются и являются эффективными в течение относительно долгого времени после применения в поле, в то время как другие гербициды быстро распадаются на другие и/или неактивные соединения. Идеальная система обработки позволила бы применение разных гербицидов, так что производители могли бы адаптировать выбор гербицидов под конкретную ситуацию.

В то время как на сегодняшний день коммерчески доступно некоторое количество устойчивых к гербицидам сельскохозяйственных культур, проблемой в применении многих коммерческих гербицидов и комбинаций гербицид/культура является то, что отдельные гербициды обычно обладают неполным

спектром активности по отношению к распространенным видам сорных трав. Для большинства отдельных гербицидов, используемых уже некоторое время, стали преобладать популяции устойчивых к гербицидам видов и биотипов сорных трав (см., например, Tranel and Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen and Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Были описаны трансгенные растения, устойчивые к более чем одному гербициду (см., например, WO 2005/012515). Тем не менее, постоянно требуются улучшения в каждом аспекте производства сельскохозяйственных культур, возможностях борьбы с сорными травами, продления остаточного контроля сорных трав и улучшения урожайности культурных растений.

Белок ГФПД или нуклеотидная последовательность в соответствии с изобретением преимущественно скомбинированы в растениях с другими генами, кодирующими белки или РНК, придающие таким растениям полезные агрономические свойства. Среди генов, кодирующих белки или РНК, придающие трансформированным растениям полезные агрономические свойства, можно упомянуть последовательности ДНК, кодирующие белки, придающие устойчивость к одному или нескольким гербицидам, которые по своей химической структуре отличаются от гербицидов, ингибирующих ГФПД, и другие, придающие устойчивость к некоторым насекомым, придающие устойчивость к некоторым болезням, ДНК, кодирующие РНК, обеспечивающие борьбу с нематодами или насекомыми, и т.п.

Подобные гены, в частности, описаны в опубликованных заявках РСТ WO 91/02071 и WO 95/06128, а также в патенте США 7,923,602 и публикации патентной заявки США № 20100166723, каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте путем ссылки.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, придающие трансформированным растительным клеткам и растениям устойчивость к определенным гербицидам, можно указать ген *bar* или *PAT* или ген *Streptomyces coelicolor*, описанный в WO 2009/152359, придающий устойчивость к глифосинатным гербицидам, ген, кодирующий пригодную EPSPS, придающий устойчивость к гербицидам, целью которых является EPSPS, таким как глифосат и его соли (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435), ген, кодирующий глифосат-н-ацетилтрансферазу (например, US 8,222,489, US 8,088,972, US 8,044,261, US 8,021,857, US 8,008,547, US 7,999,152, US 7,998,703, US 7,863,503, US 7,714,188, US 7,709,702, US 7,666,644, US 7,666,643, US 7,531,339, US 7,527,955, и US 7,405,074), или ген, кодирующий глифозатоксидоредуктазу (например, US 5,463,175).

Среди последовательностей ДНК, кодирующих пригодную EPSPS, придающих устойчивость к гербицидам, целью которых является EPSPS, можно более конкретно упомянуть ген, кодирующий растительную EPSPS, в частности EPSPS маиса, в частности EPSPS маиса, содержащую две мутации, в частности мутацию в аминокислотном положении 102 и мутацию в аминокислотном положении 106 (WO 2004/074443), и которая описана в патентной заявке US 6566587, в дальнейшем именуется как двойная мутантная EPSPS маиса или 2mEPSPS, или ген, кодирующий EPSPS, выделенную из *Agrobacterium* и описываемую последовательностью ID No. 2 и последовательностью ID No. 3 патента США 5,633,435, также обозначаемую CP4.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих пригодную EPSPS, придающих устойчивость к гербицидам, целью которых является EPSPS, можно более конкретно упомянуть ген, кодирующий EPSPS GRG23 из *Arthrobacter globiformis*, а также и мутантные GRG23 ACE1, GRG23 ACE2, или GRG23 ACE3, в частности мутанты или варианты GRG23, как описано в WO 2008/100353, такие как GRG23(ace3)R173K SEQ ID No. 29 в WO 2008/100353.

В случае кодирующих EPSPS последовательностей ДНК и в частности кодирующих вышеперечисленные гены, кодирующая эти ферменты последовательность преимущественно предваряется последовательностью, кодирующей транзитный пептид, в частности "оптимизированный транзитный пептид", описанный в патенте США 5,510,471 или 5,633,448.

Примерные признаки устойчивости к гербицидам, которые могут быть скомбинированы с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением также включают по меньшей мере один ингибитор АЛС (ацетолактатсинтазы (WO 2007/024782); мутировавший ген *Agabidopsis ALS/AHAS* (патент США 6,855,533); гены, кодирующие 2,4-D-монооксигеназы, придающие устойчивость к 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоте) путем метаболизации (патент США 6,153,401); и гены, кодирующие монооксигеназы дикамба, придающие устойчивость к дикамбе (3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоте) путем метаболизации (US 2008/0119361 и US 2008/0120739).

В различных вариантах осуществления ГФПД в соответствии с изобретением собрана с одним или большим количеством генов устойчивости к гербицидам, включая один или более дополнительных генов устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД, и/или один или большее количество генов, устойчивых к глифосату и/или глифосинату. В одном варианте осуществления, ГФПД в соответствии с изобретением скомбинирована с 2mEPSPS и *bar*.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, касающиеся свойств устойчивости к насекомым, стоит упомянуть белки Bt, широко описанные в литературных источниках и хорошо известные специалистам в данной области. Также стоит упомянуть белки, выделенные из бактерий, таких как *Photorhabdus* (WO 97/17432 и WO 98/08932).

Среди таких последовательностей ДНК, кодирующих целевые белки, придающие новые свойства устойчивости к насекомым, стоит более конкретно упомянуть белки Vt Cry или VIP, широко описанные в литературных источниках и хорошо известные специалистам в данной области. Они включают белок Cry1F или гибриды, полученные из белка Cry1F (например, гибридные белки Cry1A-Cry1F описанные в US 6,326,169; US 6,281,016; US 6,218,188, или их токсичные фрагменты), белки типа Cry1A или их токсичные фрагменты, предпочтительно белок Cry1Ac или гибриды, полученные из белка Cry1Ac (например, гибридный белок Cry1Ab-Cry1Ac, описанный в US 5,880,275) или белок Cry1Ab или Bt2 или их инсектицидные фрагменты, как описано в EP451878, белки Cry2Ae, Cry2Af или Cry2Ag, как описано в WO 2002/057664 или их токсичные фрагменты, белок Cry1A.105, описанный в WO 2007/140256 (SEQ ID No. 7) или его токсичный фрагмент, белок VIP3Aa19 под номером в каталоге NCBI ABG20428, белок VIP3Aa20 под номером в каталоге ABG20429 (SEQ ID No. 2 в WO 2007/142840), белки VIP3A, вырабатываемые в событиях хлопчатника COT202 или COT203 (WO 2005/054479 и соответственно WO 2005/054480), белки Cry, как описано в WO2001/47952, белок VIP3Aa или его токсичный фрагмент, как описано в Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci U S A. 28;93(11):5389-94 и US 6,291,156, инсектицидные белки из штаммов видов *Xenorhabdus* (как описано в WO 98/50427), *Serratia* (в частности из *S. entomophila*) или видов *Photorhabdus*, такие как Tc-белки из *Photorhabdus*, как описано в WO98/08932 (например, Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; Ffrench-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5):828-33). Также в настоящее изобретение включены любые варианты и мутанты любого из этих белков, отличающиеся несколькими (1-10, предпочтительно 1-5) аминокислотами от любой из приведенных выше последовательностей, в особенности последовательности их токсичного фрагмента, или которые слиты с транзитным пептидом, таким как пластидный транзитный пептид или любой другой белок или пептид.

В различных вариантах осуществления последовательность ГФПД в соответствии с изобретением может быть скомбинирована в растениях с одним или большим количеством генов, придающих необходимый признак, такой как устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к засухе, борьба с нематодами, эффективность использования воды, эффективность использования азота, улучшенная питательная ценность, устойчивость к болезням, улучшенный фотосинтез, улучшенное качество волокон, устойчивость к стрессам, улучшенное размножение и т.п.

В особенности пригодными трансгенные события, которые могут быть скомбинированы с генами в соответствии с настоящим изобретением в растениях того же вида (например, скрещиванием или ретрансформацией растения, содержащего другое трансгенное событие, с химерным геном в соответствии с изобретением), включают событие 531/ PV-GHVK04 (хлопчатник, борьба с насекомыми, описано в WO 2002/040677), событие 1143-14A (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2006/128569); событие 1143-51B (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2006/128570); событие 1445 (хлопчатник, устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в US-A 2002-120964 или WO 2002/034946Event 17053 (рис, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-9843, описано в WO 2010/117737); событие 17314 (рис, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-9844, описано в WO 2010/117735); событие 281-24-236 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-6233, описано в WO 2005/103266 или US-A 2005-216969); событие 3006-210-23 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-6233, описано в US-A 2007-143876 или WO 2005/103266); событие 3272 (кукуруза, признаки качества, депонировано как РТА-9972, описано в WO 2006/098952 или US-A 2006-230473); событие 33391 (пшеница, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-2347, описано в WO 2002/027004), событие 40416 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как ATCC РТА-11508, описано в WO 11/075593); событие 43A47 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как ATCC РТА-11509, описано в WO 2011/075595); событие 5307 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонировано как ATCC РТА-9561, описано в WO 2010/077816); событие ASR-368 (полевица, устойчивость к гербицидам, депонировано как ATCC РТА-4816, описано в US-A 2006-162007 или WO 2004/053062); событие B16 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в US-A 2003-126634); событие BPS-CV127-9 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как NCIMB № 41603, описано в WO 2010/080829); событие BLR1 (масличный рапс, восстановление стерильности мужских особей, депонировано как NCIMB 41193, описано в WO 2005/074671); событие CE43-67B (хлопчатник, борьба с насекомыми, депонировано как DSM ACC2724, описано в US-A 2009-217423 или WO 2006/128573); событие CE44-69D (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в US-A 2010-0024077); событие CE44-69D (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2006/128571); событие CE46-02A (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2006/128572); событие COT102 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в US-A 2006-130175 или WO 2004/039986); событие COT202 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в US-A 2007-067868 или WO 2005/054479); событие COT203 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2005/054480); событие DAS21606-3 / 1606 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11028, описано в WO 2012/033794), событие DAS40278 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как ATCC РТА-10244, описано в WO 2011/022469);

событие DAS-44406-6 / pDAB8264.44.06.1 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11336, описано в WO 2012/075426), событие DAS-14536-7 /pDAB8291.45.36.2 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11335, описано в WO 2012/075429), событие DAS-59122-7 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА 11384 , описано в US-A 2006-070139); событие DAS-59132 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в WO 2009/100188); событие DAS68416 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-10442, описано в WO 2011/066384 или WO 2011/066360); событие DP-098140-6 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-8296, описано в US-A 2009-137395 или WO 08/112019); событие DP-305423-1 (соевые бобы, признаки качества, не депонировано, описано в US-A 2008-312082 или WO 2008/054747); событие DP-32138-1 (кукуруза, система гибридизации, депонировано как АТСС РТА-9158, описано в US-A 2009-0210970 или WO 2009/103049); событие DP-356043-5 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-8287, описано в US-A 2010-0184079 или WO 2008/002872); событие EE-1 (баклажан, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 07/091277); событие F1117 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 209031, описано в US-A 2006-059581 или WO 98/044140); событие FG72 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11041, описано в WO 2011/063413), событие GA21 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 209033, описано в US-A 2005-086719 или WO 98/044140); событие GG25 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 209032, описано в US-A 2005-188434 или WO 98/044140); событие GHB119 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-8398, описано в WO 2008/151780); событие GHB614 (хлопчатник, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-6878, описано в US-A 2010-050282 или WO 2007/017186); событие GJ11 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 209030, описано в US-A 2005-188434 или WO 98/044140); событие GM RZ13 (сахарная свекла, устойчивость к вирусам, депонировано как NCIMB-41601, описано в WO 2010/076212); событие H7-1 (сахарная свекла, устойчивость к гербицидам, депонировано как NCIMB 41158 или NCIMB 41159, описано в US-A 2004-172669 или WO 2004/074492); событие JOPLIN1 (пшеница, устойчивость к болезням, не депонировано, описано в US-A 2008-064032); событие LL27 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как NCIMB41658, описано в WO 2006/108674 или US-A 2008-320616); событие LL55 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как NCIMB 41660, описано в WO 2006/108675 или US-A 2008-196127); событие LLcotton25 (хлопчатник, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-3343, описано в WO 2003/013224 или US-A 2003-097687); событие LLRICE06 (рис, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 203353, описано в US 6,468,747 или WO 2000/026345); событие LLRice62 (рис, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС 203352, описано в WO 2000/026345), событие LLRICE601 (рис, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-2600, описано в US-A 2008-2289060 или WO 2000/026356); событие LY038 (кукуруза, признаки качества, депонировано как АТСС РТА-5623, описано в US-A 2007-028322 или WO 2005/061720); событие MIR162 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонировано как РТА-8166, описано в US-A 2009-300784 или WO 2007/142840); событие MIR604 (кукуруза, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в US-A 2008-167456 или WO 2005/103301); событие MON15985 (хлопчатник, борьба с насекомыми, депонировано как АТСС РТА-2516, описано в US-A 2004-250317 или WO 2002/100163); событие MON810 (кукуруза, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в US-A 2002-102582); событие MON863 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонировано как АТСС РТА-2605, описано в WO 2004/011601 или US-A 2006-095986); событие MON87427 (кукуруза, контроль опыления, депонировано как АТСС РТА-7899, описано в WO 2011/062904); событие MON87460 (кукуруза, устойчивость к стрессам, депонировано как АТСС РТА-8910, описано в WO 2009/111263 или US-A 2011-0138504); событие MON87701 (соевые бобы, борьба с насекомыми, депонировано как АТСС РТА-8194, описано в US-A 2009-130071 или WO 2009/064652); событие MON87705 (соевые бобы, признаки качества -устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-9241, описано в US-A 2010-0080887 или WO2010/037016); событие MON87708 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-9670, описано в WO 2011/034704); событие MON87712 (соевые бобы, урожайность, депонировано как РТА-10296, описано в WO 2012/051199), событие MON87754 (соевые бобы, признаки качества, депонировано как АТСС РТА-9385, описано в WO 2010/024976); событие MON87769 (соевые бобы, признаки качества, депонировано как АТСС РТА-8911, описано в US-A 2011-0067141 или WO 2009/102873); событие MON88017 (кукуруза, борьба с насекомыми -устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-5582, описано в US-A 2008-028482 или WO 2005/059103); событие MON88913 (хлопчатник, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-4854, описано в WO 2004/072235 или US-A 2006-059590); событие MON88302 (масличный рапс, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-10955, описано в WO 2011/153186), событие MON88701 (хлопчатник, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11754, описано в WO 2012/134808), событие MON89034 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонировано как АТСС РТА-7455, описано в WO 07/140256 или US-A 2008-260932); событие MON89788 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-6708, описано в US-A 2006-282915 или WO 2006/130436); событие MS11 (масличный рапс, контроль опыления - устойчи-

вость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-850 или РТА-2485, описано в WO 2001/031042); событие MS8 (масличный рапс, контроль опыления - устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-730, описано в WO 2001/041558 или US-A 2003-188347); событие NK603 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-2478, описано в US-A 2007-292854); событие PE-7 (рис, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2008/114282); событие RF3 (масличный рапс, контроль опыления -устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-730, описано в WO 2001/041558 или US-A 2003-188347); событие RT73 (масличный рапс, устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в WO 2002/036831 или US-A 2008-070260); событие SYHT0H2 / SYN-000H2-5 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11226, описано в WO 2012/082548), событие T227-1 (сахарная свекла, устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в WO 2002/44407 или US-A 2009-265817); событие T25 (кукуруза, устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в US-A 2001-029014 или WO 2001/051654); событие T304-40 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-8171, описано в US-A 2010-077501 или WO 2008/122406); событие T342-142 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонировано, описано в WO 2006/128568); событие TC1507 (кукуруза, борьба с насекомыми -устойчивость к гербицидам, не депонировано, описано в US-A 2005-039226 или WO 2004/099447); событие VIP1034 (кукуруза, борьба с насекомыми -устойчивость к гербицидам, депонировано как АТСС РТА-3925., описано в WO 2003/052073), событие 32316 (кукуруза, борьба с насекомыми-устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11507, описано в WO 2011/084632), событие 4114 (кукуруза, борьба с насекомыми-устойчивость к гербицидам, депонировано как РТА-11506, описано в WO 2011/084621), событие EE-GM3 / FG72 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-11041) необязательно собранное с событием EE-GM1/LL27 или событие EE-GM2/LL55 (WO 2011/063413 A2), событие DAS-68416-4 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-10442, WO 2011/066360A1), событие DAS-68416-4 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-10442, WO 2011/066384 A1), событие DP-040416-8 (кукуруза, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-11508, WO 2011/075593 A1), событие DP-043A47-3 (кукуруза, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-11509, WO 2011/075595 A1), событие DP-004114-3 (кукуруза, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-11506, WO2011/084621 A1), событие DP-032316-8 (кукуруза, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-11507, WO 2011/084632 A1), событие MON-88302-9 (масличный рапс, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-10955, WO 2011/153186 A1), событие DAS-21606-3 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-11028, WO 2012/033794 A2), событие MON-87712-4 (соевые бобы, признаки качества, АТСС учетный номер. РТА-10296, WO2012/051199 A2), событие DAS-44406-6 (соевые бобы, накопленная устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер. РТА-11336, WO2012/075426A1), событие DAS-14536-7 (соевые бобы, накопленная устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер. РТА-11335, WO 2012/075429A1), событие SYN-000H2-5 (соевые бобы, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-11226, WO 2012/082548 A2), событие DP-061061-7 (масличный рапс, устойчивость к гербицидам, номер депонирования недоступен, WO 2012071039 A1), событие DP-073496-4 (масличный рапс, устойчивость к гербицидам, номер депонирования недоступен, US 2012131692), событие 8264.44.06.1 (соевые бобы, накопленная устойчивость к гербицидам, учетный номер РТА-11336, WO 2012075426 A2), событие 8291.45.36.2 (соевые бобы, накопленная устойчивость к гербицидам, учетный номер. РТА-11335, WO 2012075429 A2), событие SYHT0H2 (соевые бобы, АТСС учетный номер. РТА-11226, WO 2012/082548 A2), событие MON88701 (хлопчатник, АТСС учетный номер РТА-11754, WO 2012/134808 A1), событие KK179-2 (люцерна, АТСС учетный номер РТА-11833, WO 2013/003558 A1), событие pDAB8264.42.32.1 (соевые бобы, накопленная устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-11993, WO 2013/010094 A1), событие MZDT09Y (кукуруза, АТСС учетный номер РТА-13025, WO 2013/012775 A1), событие 4114 (маис, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-11506) WO 201314901, событие MON87411 (маис, АТСС учетный номер РТА-12669) WO 2013169923, событие A26-5 (хлопчатник, борьба с насекомыми) WO 2013170398, событие A2-6 (хлопчатник, борьба с насекомыми) WO2013170399, событие 9582.816.15.1 (соевые бобы, борьба с насекомыми, устойчивость к гербицидам), АТСС учетный номер РТА-12588) WO 2014004458, событие 33121 (маис, борьба с насекомыми, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-13392) WO 2014116854, событие 32218 (маис борьба с насекомыми, устойчивость к гербицидам, АТСС учетный номер РТА-13391) WO 2014116989, событие "SPT-7R-949D SPT-7R-1425D" (мужская стерильность риса) WO 2014154115, событие MON87751 (соевые бобы, АТСС учетный номер. PYA-120166) WO 2014201235, событие "Pp009-401 Pp009-415 Pp009-469" (дернина, АТСС учетный номер РТА-120354, РТА-120353, РТА-120355) WO 2015006774, событие Bs2-X5 (томат, АТСС) WO 2015017637, событие MON87403 (маис, урожай зерна, АТСС учетный номер РТА-13584 WO 2015053998, событие 32218 (маис, борьба с насекомыми, АТСС учетный номер РТА-13391) WO 2015112182.

Ф. Полинуклеотидные конструкции.

Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды ГФПД в соответствии с настоящим изобретением, могут быть модифицированы для получения или усиления экспрессии в растительных клетках. Полинуклеотиды, кодирующие идентифицированные в настоящем изобретении полипептиды, могут быть обес-

печены в экспрессионных кассетах для экспрессии в соответствующем растении. "Экспрессионная кассета растения" включает конструкцию ДНК, включая рекомбинантную конструкцию ДНК, способную приводить к экспрессии полинуклеотида в растительной клетке. Кассета может включать в направлении 5'-3' транскрипции область инициации транскрипции (т.е. промотор, в частности гетерологичный промотор) функционально соединенный с одним или несколькими соответствующими полинуклеотидами, и/или область терминации трансляции и транскрипции (т.е. область терминации), которые функционируют в растениях. Кассета также может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный вводимый в организм полинуклеотид, такой как селектируемый маркерный ген. Альтернативно, дополнительный полинуклеотид(ы) может быть обеспечен на кассетах множественной экспрессии. Подобная экспрессионная кассета обеспечена множеством сайтов рестрикции для вставки полинуклеотида(ов) так, чтобы он подпадал под регуляцию транскрипции в регуляторных областях.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к химерному гену, содержащему кодирующую последовательность, которая включает гетерологичную нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением, функционально связанную с экспрессируемым в растениях промотором и необязательно участком прерывания транскрипции и полиаденилирования. "Гетерологичный" в общем, относится к полинуклеотиду или полипептиду, не являющемуся эндогенным для клетки или не являющемуся эндогенным для расположения в природном геноме, в котором он наличествует, и добавленному в клетку путем инфекции, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции или т.п. Под "функциональной связью" подразумевают функциональную связь между двумя полинуклеотидами. Например, когда промотор функционально связан с последовательностью ДНК, то последовательность промотора инициирует и выступает промежуточным звеном в транскрипции последовательности ДНК. Признано, что функционально соединенные полинуклеотиды могут быть смежными, а могут и не быть, и там, где этот термин используют для обозначения соединения двух кодирующих полипептид участков, полипептиды экспрессируются в одной и той же рамке считывания.

Промотором может быть любая полинуклеотидная последовательность, демонстрирующая транскрипционную активность в выбранных растительных клетках, частях растений или растениях. Промотор может быть природным или аналогичным, или же чужеродным и гетерологичным, по отношению к растению-хозяину и/или последовательности ДНК в соответствии с изобретением. Если промотор является "природным" или "аналогичным" по отношению к растению-хозяину, то подразумевают, что промотор присутствует в природном растении, в которое его вводят. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к последовательности ДНК в соответствии с изобретением, то подразумевают, что промотор не является естественным или встречающимся в природе промотором для функционально связанной с ним последовательности ДНК в соответствии с изобретением. Промотор может быть индуцируемым или конститутивным. Он может встречаться в природе, быть составленным из частей различных встречающихся в природе промоторов, или же может быть частично или полностью синтетическим. Руководство по проектированию промоторов предоставляют исследования структуры промоторов, такие как у Harley and Reynolds (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361. Кроме того, может быть оптимизировано расположение промотора относительно старта транскрипции. См, например, Roberts et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. США*, 76:760-764. Для применения в растениях в этой области техники хорошо известны много пригодных промоторов.

К примеру, пригодные конститутивные промоторы для применения в растениях включают: промоторы вирусов растений, таких как промотор каулимовируса хлоротичной полосатости арахиса (PC1SV) (патент США № 5,850,019); промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) (Odell и др. (1985) *Nature* 313:810-812); промоторы метилтрансферазных генов вируса *Chlorella* (патент США № 5,563,328) и полноразмерный промотор транскрипции вируса мозаики норичника (FMV) (Патент США № 5,378,619); промоторы таких генов, как рисовый актин (McElroy и др. (1990) *Plant Cell* 2:163-171 и патент США № 5,641,876); убиквитин (Christensen и др. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 и Christensen и др. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last и др. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten и др. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730 и патент США № 5,510,474); гистон H3 кукурузы (Lepetit и др. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231:276-285 и Atanassova и др. (1992) *Plant J.* 2(3):291-300); *Brassica napus* ALS3 (PCT-заявка WO 97/41228); ген малой субъединицы растительной рибулозо-бискарбоксылазы/оксигеназы (RuBisC); цирковирус (AU 689 311) или вирус мозаики прожилок маниоки (CsVMV, US 7,053,205); а также промоторы различных генов *Agrobacterium* (см. патенты США № 4,771,002; 5,102,796; 5,182,200; и 5,428,147).

Пригодные индуцируемые промоторы для использования в растениях включают: промотор из системы ACE1, реагирующий на медь (Mett и др. (1993) *PNAS* 90:4567-4571); промотор гена кукурузы In2, реагирующий на бензолсульфонамидные гербицидные сафенеры (Hershey и др. (1991) *Mol. Gen. Genetics* 227:229-237 и Gatz и др. (1994) *Mol. Gen. Genetics* 243:32-38); а также промотор репрессора Tet из Tn10 (Gatz и др. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237). Другим индуцируемым промотором для использования в растениях является тот, который реагирует на индуцирующий агент, на который растения в норме не реагируют. Примером индуцируемого промотора такого типа является индуцируемый промотор гена стероидного гормона, транскрипционная активность которого индуцируется гормоном-

глюкокортикостероидом (Schena и др. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. США 88:10421) или недавнее применение химерного активатора транскрипции, XVE, для использования в основанной на рецепторе эстрогена индуцируемой системе экспрессии в растениях, активируемой эстрадиолом (Zuo и др. (2000) Plant J., 24:265-273). Другие индуцируемые промоторы для использования в растениях описаны в EP 332104, PCT WO 93/21334 и PCT WO 97/06269, которые включены в данное описание в полном объеме путем ссылки. Могут быть также использованы промоторы, составленные из частей других промоторов, и частично или полностью синтетические промоторы. См., напр., Ni и др. (1995) Plant J. 7:661-676 и PCT WO 95/14098, описывающие такие промоторы для применения в растениях.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для экспрессии белков ГФПД в соответствии с изобретением может быть использована последовательность промотора, специфическая для конкретных участков или тканей растений, такая как промоторы, специфичные для семян (Datla, R. и др., 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296), особенно промотор напина (EP 255 378 A1), промотор фазеолина, промотор глютенина, промотор гелиантинина (WO 92/17580), промотор альбумина (WO 98/45460), промотор олеозина (WO 98/45461), промотор SAT1 или промотор SAT3 (PCT/US98/06978).

Также можно использовать индуцируемый промотор, преимущественно выбранный из фенилаланинаммониолиазы (ФАЛ), HMG-КоА редуктазы (HMG), хитиназы, глюканазы, ингибитора протеиназы (ИП), гена семейства PR1, нопалинсинтазы (nos) и промоторов *vspB* (US 5 670 349, табл. 3), промотора HMG2 (US 5 670 349), промотора яблочной бета-галактозидазы (ЯБГ1) и промотора яблочной аминокислотопропанкарбоксилатсинтазы (АЦК-синтазы) (WO 98/45445). В конструкциях в соответствии с изобретением могут быть использованы многочисленные промоторы, в том числе следующие друг за другом.

Промотор может включать, или быть модифицированным так, чтобы включать один или более элементов-энхансеров. В некоторых вариантах осуществления промотор может включать множество элементов-энхансеров. Промоторы, содержащие элементы-энхансеры, обеспечивают более высокие уровни транскрипции по сравнению с не содержащими их промоторами. Пригодные для использования в растениях элементы-энхансеры включают элемент-энхансер PC1SV (патент США № 5,850,019), элемент-энхансер CaMV 35S (патент США № 5,106,739 и 5,164,316) и элемент-энхансер FMV (Maiti и др. (1997) Transgenic Res. 6:143-156); активатор трансляции вируса табачной мозаики (TMV), описанный в заявке WO 87/07644, или вируса табачной гравировки (TEV), описанных Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597, например, или интронов, таких как интрон *adh1* кукурузы или интрон 1 рисового актина. См. также PCT WO96/23898, WO 2012/021794, WO 2012/021797, WO 2011/084370 и WO 2011/028914.

Часто подобные конструкции могут содержать 5' и 3' нетранслируемые области. Подобные конструкции могут содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность" для облегчения ко-трансляционного или посттрансляционного транспорта рассматриваемого пептида до определенных внутриклеточных структур, таких как хлоропласты (или другие пластиды), эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи, или же быть секреторируемым. Например, конструкция может быть спроектирована таким образом, чтобы содержать сигнальный пептид для облегчения перехода пептида в эндоплазматический ретикулум. Под "сигнальной последовательностью" следует понимать последовательность, о которой известно или предполагается, что результатом ее действия является ко-трансляционный или посттрансляционный транспорт пептида через клеточную мембрану. У эукариотов это обычно включает секрецию в аппарат Гольджи, с некоторым результирующим гликозилированием. Под "лидерной последовательностью" следует понимать любую последовательность, которая при трансляции дает аминокислотную последовательность, достаточную для запуска ко-трансляционного транспорта пептидной цепи в субклеточную органеллу. Таким образом, это включает лидерные последовательности, нацеленные на транспорт и/или гликозилирование через переход в эндоплазматический ретикулум, переход в вакуоли, пластиды, включая хлоропласты, митохондрии и т.п. Может также оказаться предпочтительным сконструировать растительную экспрессионную кассету, содержащую интрон, так что для экспрессии необходим процессинг этого интрона в мРНК.

Под "3' нетранслируемым участком" следует понимать полинуклеотид, расположенный ниже кодирующей последовательности. Сигнальные последовательности полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на прибавление участков полиадениловой кислоты к 3'-концу прекурсора мРНК, являются 3'-нетранслируемыми участками. Под "5' нетранслируемым участком" следует понимать полинуклеотид, расположенный выше кодирующей последовательности.

Другие нетранслируемые элементы выше или ниже включают энхансеры. Энхансеры представляют собой полинуклеотиды, действие которых усиливает экспрессию участка-промотора. Энхансеры хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ними, участок-энхансер SV40 и участок-энхансер 35S.

Область терминирования может быть родственной с областью инициации транскрипции, может быть родной с последовательностью в соответствии с настоящим изобретением, или может быть получена из другого источника. Пригодные области терминирования доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как области терминирования октопинсинтазы и нопалинсинтазы. См. также Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et

al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639; и Европейскую патентную заявку EP 0 633 317 A1.

В одном из аспектов изобретения синтетические последовательности ДНК проектируются для заданного полипептида, такого как полипептиды в соответствии с изобретением. Экспрессия открытой рамки считывания синтетической последовательности ДНК в клетке приводит к выработке полипептида в соответствии с изобретением. Синтетические последовательности ДНК могут быть полезны для простого устранения нежелательных сайтов рестрикции эндонуклеаз, для способствования стратегиям клонирования ДНК, для изменения или устранения любого потенциального смещения кодонов, для изменения или улучшения содержания ГЦ, для устранения или изменения альтернативных рамок считывания, и/или для устранения или изменения сайтов распознавания сплайсинга интронов/экзонов, сайтов полиаденилирования, последовательностей Шайна-Дальгарно, нежелательных элементов-промоторов и т.п., которые могут присутствовать в нативной последовательности ДНК. Возможно также использование синтетических последовательностей ДНК для введения других улучшений в последовательности ДНК, таких как введение интронной последовательности, создание последовательности ДНК, которая экспрессируется как слитый белок к нацеленным на органеллы последовательностям, таким как транзитные пептиды хлоропластов, нацеленные на апопласты/вакуоли пептиды, или пептидные последовательности, приводящие к удерживанию результирующего пептида в эндоплазматическом ретикулуме. Синтетические гены могут также быть синтезированы с использованием предпочтительных для клетки-хозяина кодонов для улучшенной экспрессии, или могут быть синтезированы с использованием кодонов с частотой, предпочтительной для хозяина. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11; Патенты США № 6,320,100; 6,075,185; 5,380,831; и 5,436,391, опубликованные патентные заявки США № 20040005600 и 20010003849, и Murtagh и др. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в данное описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления целевые полинуклеотиды для экспрессии нацелены на хлоропласт. В этом способе, если целевой полинуклеотид не вводится напрямую в хлоропласт, то экспрессионная кассета дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий транзитный пептид для направления целевого нуклеотида в хлоропласты. Подобные транзитные пептиды известны в данной области техники. См., например, Von Heijne и др. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark и др. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa и др. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer и др. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; и Shah и др. (1986) *Science* 233:478-481.

Целевые полинуклеотиды, направляемые в хлоропласт, могут быть оптимизированы для экспрессии в хлоропласте с учетом разницы в использовании кодонов в растительном ядре и этой органелле. Таким способом целевые полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием предпочтительных для хлоропластов кодонов. См., например, патент США № 5,380,831, включенный в данное описание посредством ссылки.

Такая экспрессионная кассета растений может быть введена в вектор трансформации растения. Под "вектором трансформации" следует понимать молекулу ДНК, делающую возможной трансформацию клетки. Подобная молекула может состоять из одной или более экспрессионных кассет и может быть организована в более чем одну векторную молекулу ДНК. Например, бинарные векторы представляют собой векторы трансформации растений, использующие два несмежных вектора ДНК для кодирования всех необходимых цис- и транс-действующих функций для трансформации растительных клеток (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Вектор" означает полинуклеотидную конструкцию, разработанную для переноса между различными клетками-хозяевами. "Вектор экспрессии" означает вектор, обладающий способностью включать, интегрировать и экспрессировать гетерологичную последовательность ДНК или ее фрагменты в чужеродной клетке.

Вектор трансформации растения содержит один или большее количество векторов ДНК для достижения трансформации растения. Например, общепринятой практикой в данной области техники является использование векторов трансформации растения, содержащих более чем один смежный сегмент ДНК. Эти векторы часто обозначаются как бинарные векторы. Бинарные векторы, как и векторы с хелперными плазмидами, наиболее часто используются для опосредованной *Agrobacterium* трансформации, где размер и сложность сегментов ДНК, требующихся для достижения эффективной трансформации, очень велики, и выгодно разделять функции на отдельные молекулы ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, содержащий цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как левый пограничный район и правый пограничный район), селективируемый маркер, спроектированный с возможностью экспрессии в растительной клетке, и "целевой полинуклеотид" (полинуклеотид, спроектированный с возможностью экспрессии в растительной клетке, для которой желательна создание трансгенных растений). Также в этом плазмидном векторе присутствуют последовательности, необходимые для бактериальной репликации. Цис-действующие последовательности расположены так, чтобы позволить эффективный трансфер в растительные клетки и экспрессию в них. Например, последовательность селективируемого маркера и целевая последовательность расположены между левым и правым пограничными районами. Часто второй плазмидный вектор содержит транс-действующие факторы, вы-

полняющие роль промежуточного звена в переносе Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Эта плаزمид часто содержит функции вирулентности (гены *Vir*), делающие возможным инфицирование растительных клеток *Agrobacterium*, и перенос ДНК путем расщепления на пограничных последовательностях и *vir*-опосредованный перенос ДНК, как это понимают в данной области техники (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science*, 5:446-451). Для трансформации растений могут быть использованы несколько типов штаммов *Agrobacterium* (напр., LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, и т.д.). Второй плазмидный вектор не является необходимым для введения полинуклеотидов в растения другими методами, такими как микропроекция, микроинъекция, электропорация, полиэтиленгликоль и т.д.

Г. Трансформация растений

Способы в соответствии с изобретением включают введение нуклеотидной конструкции в растение. Под "введением" следует понимать презентацию нуклеотидной конструкции растению таким способом, что упомянутая конструкция получает доступ вовнутрь клетки растения. Способы в соответствии с изобретением не требуют использования особенного метода для введения нуклеотидной конструкции в растение, только того, чтобы нуклеотидная конструкция получила доступ вовнутрь по меньшей мере одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструкций в растения известны в данной области, включая, но не ограничиваясь ними, или методы стабильной трансформации, временной трансформации и опосредованные вирусами методы. См., например, способы трансформации растительных клеток и регенерации растений, описанные в: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159 A1, EP 604 662 A1, EP 672 752 A1, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174 A1, EP 486 233 A1, EP 486 234 A1, EP 539 563 A1, EP 674 725 A1, WO 9 1/02071, WO 95/06128, WO 2011/095460, WO 2012006439 A2, WO 2012006443 A2, WO 2012015039 A1, WO 2012019660 A1, WO 2012021494A1, WO 2012064827 A1, WO 2012075562A1, WO 2012077664A1, WO 2012083137A1, WO 2012084962A1, WO 2012092577 A1, WO 2012109947 A1, WO 2012129443 A2, WO 2012138629 A2, WO 2012139416 A1, WO 2012149011 A1, WO 2013014585 A1, WO 2013025670 A1, WO 2013033308 A2, WO 2013066007 A1, WO 2013077420 A1, WO 2013090734 A1, WO 2013149726 A1, WO 2013180311 A1, WO 2014029044 A1, WO 2014029045 A1, WO 2014062036 A1, WO 2014065857 A1, WO 2014100234 A1, WO 2014100406 A1, WO 2014123208 A1, WO 2014143304 A1, WO 2014144513 A2, WO 2014157541 A1, WO 2014200842 A2, WO 2015051083 A1, WO 2015077620 A1, WO 2015085990 A1, WO 2015099674 A1, WO 2015118640 A1, WO 2015119166 A1, каждый из которых включен в данное описание путем ссылки, особенно в отношении описанных методов трансформации.

В целом, методы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые растительные клетки (напр., незрелые или зрелые эмбрионы, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.), за которым следует применение максимального порогового уровня пригодного селектора (в зависимости от гена селективируемого маркера) для выделения трансформированных клеток растений из нетрансформированной клеточной массы. Эксплантаты обычно переносят в такую же свежую среду и культивируют в плановом порядке. После этого трансформированные клетки дифференцируют в ростки после помещения в регенерационную среду с добавлением максимального порогового уровня селективного агента. Ростки затем переносят на селективную среду для укоренения с целью получения укоренившегося ростка или саженца. Трансгенные саженцы затем выращивают до зрелых растений и они вырабатывает плодородные семена (напр., Hiei и др. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida и др. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Эксплантаты обычно переносят в такую же свежую среду и культивируют в плановом порядке. Общее описание техник и методов создания трансгенных растений можно найти у Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 and Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит много клеток, то в любой части подвергаемого обработке целевого каллуса или ткани или группы клеток присутствуют как трансформированные, так и нетрансформированные клетки. Способность убивать нетрансформированные клетки и позволять трансформированным клеткам разрастаться приводит к трансформированным культурам растений. Часто способность убивать нетрансформированные клетки является ограничением быстрого выделения трансформированных клеток и успешного создания трансгенных растений. Для подтверждения присутствия интегрированного гетерологичного целевого гена в геноме трансгенного растения могут быть использованы молекулярные и биохимические методы.

Создание трансгенных растений может быть осуществлено одним или несколькими методами, включая, но не ограничиваясь ними, введение гетерологичной ДНК в клетки растений с помощью *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-опосредованная трансформация), бомбардировка растительных клеток гетерологичной чужеродной ДНК, прикрепленной к частицам, и различные другие прямые или опосредованные методы переноса ДНК без участия частиц (напр., Hiei и др. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida и др. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239; Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120).

Методы трансформации хлоропластов известны в данной области техники. См., напр., Svab и др. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 90:913-

917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Метод основан на доставке ДНК, содержащей селективный маркер, с помощью генной пушки, и нацеливании ДНК на пластидный геном через гомологическую рекомбинацию. Кроме того, трансформация пластид может быть выполнена трансактивацией молчащего устойчивого пластидом трансгена путем предпочтительной тканевой экспрессии ядернокодируемой пластидонаправленной РНК-полимеразы. О такой системе сообщалось в McBride и др. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 91:7301-7305.

Трансформированные растительные клетки могут быть выращены до растений согласно стандартным методикам. См., напр., McCormick и др. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Эти растения могут быть выращены и опылены таким же трансформированным штаммом или другими штаммами, с получением гибрида, имеющего конститутивную экспрессию желаемой фенотипической характеристики. Могут быть выращены два или несколько поколений, чтобы убедиться, что экспрессия желаемой фенотипической характеристики стабильно поддерживается и наследуется, а затем могут быть собраны семена для того, чтобы убедиться, что экспрессия желаемой фенотипической характеристики достигнута. Таким способом настоящее изобретение предоставляет трансформированное семя (также обозначается как "трансгенное семя"), содержащее нуклеотидную конструкцию в соответствии с изобретением, например, экспрессионную кассету в соответствии с изобретением, стабильно включенную в геном. В различных вариантах осуществления семя может быть покрыто по меньшей мере одним фунгицидом и/или по меньшей мере одним инсектицидом, по меньшей мере одним гербицидом, и/или по меньшей мере одним сафенером, или любой их комбинацией.

Н. Оценка трансформации растений.

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растений трансформацию или интегрирование гетерологичного гена в геном растения подтверждают различными методами, такими как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

Быстрым способом скрининга трансформированных клеток, тканей или ростков на присутствие включенного гена на ранней стадии перед пересадкой в грунт является анализ ПЦР (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)). ПЦР осуществляют, используя олигонуклеотидные праймеры, специфичные для целевого гена, или векторный фон *Agrobacterium* и т.п.

Трансформация растений может быть подтверждена саузерн-блот-анализом геномной ДНК (Sambrook and Russell (2001) *supra*). В целом, общую ДНК экстрагируют из трансформанта, расщепляют с помощью пригодных ферментов-рестриктаз, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Мембрана или "блот" затем может быть зондирована, например, меченным радиоактивным ³²P фрагментом целевой ДНК для подтверждения включения введенного гена в геном растения в соответствии со стандартными методиками (Sambrook and Russell, 2001, выше).

В нозерн-анализе выделяют РНК из конкретных тканей трансформанта, фракционируют в формальдегид-агарозном геле и наносят на нейлоновый фильтр в соответствии со стандартными процедурами, обычно используемыми в данной области (Sambrook and Russell, 2001 *supra*). Экспрессию РНК, кодируемой нуклеотидными последовательностями в соответствии с изобретением, затем проверяют гибридизацией фильтра с радиоактивным зондом, полученным из GDC известными методами (Sambrook and Russell (2001) выше). РНК также может быть выявлена и/или определена количественно с использованием ПЦР с обратной транскриптазой, как известно в уровне техники (напр., Green and Sambrook (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4^е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY).

Трансгенные растения могут быть проанализированы методами вестерн-блоттинга, ELISA, тестами с растекающейся каплей жидкости и биохимическими анализами, для определения присутствия белка, кодируемого геном устойчивости к гербициду, путем стандартных процедур (Sambrook and Russell (2001) *supra*), используя антитела, связывающиеся с одним или более эпитопом, присутствующим на белке устойчивости к гербициду.

В одном из аспектов изобретения, описанные в настоящем изобретении гены ГФПД пригодны в качестве маркеров оценки трансформации бактериальных или растительных клеток.

7. Применение в качестве маркера трансформации.

Изобретение также относится к применению в способе трансформации растений нуклеиновой кислоты, кодирующей ГФПД в соответствии с изобретением, в качестве маркерного гена или в качестве кодирующей последовательности, делающей возможным придание растению устойчивости к гербицидам, которые являются ингибиторами ГФПД, и применения одного или большего количества ингибитора (-ов) ГФПД на растениях, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей ГФПД в соответствии с изобретением. См., напр., патент США 6,791,014, включенный в настоящее описание в полном объеме путем ссылки.

В этом варианте осуществления ингибитор ГФПД может быть введен в культуральную среду компетентных растительных клеток, чтобы обесцетить упомянутые клетки перед трансформацией. Обесцетенные компетентные клетки затем трансформируют геном устойчивости к ингибиторам ГФПД, как селективируемым маркером, и трансформированные клетки, включившие указанный маркер в свой геном, становятся зелеными, делая возможным их выделение. Подобный процесс может уменьшить время, не-

обходимое на отбор трансформированных клеток.

Таким образом, один из вариантов осуществления настоящего изобретения заключается в способе трансформирования растительных клеток введением гетерологичного гена в указанные растительные клетки с геном устойчивости к ингибиторам ГФПД в качестве селективируемого маркера, при этом способ включает подготовку и культивирование компетентных растительных клеток, способных принять гетерологичный ген, на подходящей среде, и введение достаточного количества ингибитора ГФПД в подходящую культуральную среду с компетентными растительными клетками. Затем компетентные клетки трансформируют гетерологичным геном и селективируемым маркером, и трансформированные клетки, содержащие гетерологичный ген, выращивают на подходящей среде и отбирают трансформанты. Трансформированные клетки затем могут быть регенерированы до плодоносного трансформированного растения.

J. Растения и части растений.

Под "растением" следует понимать целое растение, органы растений (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, растительные клетки, побеги, эмбрионы и их потомство. Растительные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными (напр., каллус, клетки в суспензионной культуре, протопласты, клетки листьев, клетки корней, клетки флоэмы, пыльца). Настоящее изобретение может быть использовано для введения полинуклеотидов в любые виды растений, включая, но не ограничиваясь ими, однодольные и двудольные. Примеры целевых растений включают, но не ограничиваются ими, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, томаты, крестоцветные, перцы, картофель, хлопчатник, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс, виды Brassica, люцерну, рожь, просо, сафлор, арахис, сладкий картофель, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, бананы, авокадо, фигов, гуаву, манго, оливу, папайю, кешью, макадамии, миндаль, овес, овощные культуры, декоративные растения и хвойные деревья.

Овощные растения включают, но не ограничиваются ими, томаты, латук, зеленый горошек, лимскую фасоль, горох и членов из рода *Cucumis*, такие как огурец, канталупа и дыня. Декоративные растения включают, но не ограничиваются ими, азалию, гортензию, гибискус, розы, тюльпаны, нарциссы, петунии, гвоздики, пуансеттию и хризантемы. Также могут представлять интерес сельскохозяйственные культуры, включая, к примеру, кукурузу, сорго, подсолнечник, томаты, крестоцветные, перцы, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т.д.

Это изобретение пригодно для любого члена семейства однодольных растений, включая, но не ограничиваясь ими, кукурузу, рис, ячмень, овес, пшеницу, сорго, рожь, сахарный тростник, ананас, ямс, лук, бананы, кокос и финики.

K. Способы повышения урожайности растений.

Обеспечиваются способы повышения урожайности растений. Способы включают обеспечение растения, содержащего полинуклеотид, или введение в растение или растительную клетку полинуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую ГФПД в соответствии с изобретением, выращивание растения или его семени в полевых условиях и сбора урожая с этих растений или семян. Как определено в настоящем изобретении "урожайность" растения обозначает качество и/или количество биомассы, продуцируемой растением. Под "биомассой" следует понимать любой измеримый растительный продукт. Повышение выработки биомассы представляет собой любое улучшение урожайности измеримого растительного продукта. Повышение урожайности растений имеет несколько коммерческих применений. К примеру, повышение биомассы листьев растений может повысить урожайность листовых овощей для употребления человеком и животными. Кроме того, повышение биомассы листьев может быть использовано для увеличения производства фармацевтических или промышленных продуктов из растений. Повышение урожайности может включать любое статистически значимое повышение, включая, но не ограничиваясь этим, повышение по меньшей мере на 1%, повышение по меньшей мере на 3%, повышение по меньшей мере на 5%, повышение по меньшей мере на 10%, повышение по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 100% или большее повышение.

В конкретных способах растение, содержащее нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, обрабатывают эффективной концентрацией гербицида, ингибирующего ГФПД, такого как один или большее количество гербицидов, ингибирующих ГФПД, выбранных из группы, включающей гербициды, ингибирующие ГФПД из класса трикетонов (предпочтительно бензобизиклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-

(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолы, причем применение гербицида приводит к повышению урожайности растения.

Также обеспечиваются способы придания устойчивости к гербицидам растению или части растения. В подобных способах в растение вводят нуклеотидную последовательность, кодирующую ГФПД в соответствии с изобретением, где экспрессия полинуклеотида приводит к устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД. Растения, созданные таким способом, могут быть обработаны эффективной концентрацией гербицида (такого как один или большее количество гербицидов-ингибиторов ГФПД, выбранных из группы, состоящей из гербицидов, ингибирующих ГФПД из такого класса, как трикетоны (предпочтительно бензобициклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидами, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамидами (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолы и проявлять повышенную устойчивость к гербициду. "Эффективная концентрация" гербицида в настоящем изобретении означает количество, достаточное для замедления или остановки роста растений или частей растений, которые не обладают врожденной или приобретенной устойчивостью к гербициду.

L. Способы борьбы с сорными травами в полевых условиях.

Настоящее изобретение также относится к способу борьбы с нежелательными растениями или регулированию роста растений в посевах растений, содержащих нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, где один или большее количество гербицидов, ингибирующих ГФПД, например, один или большее количество гербицидов, ингибирующих ГФПД, выбраны из группы, состоящей из такого класса, как трикетоны (предпочтительно бензобициклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидами, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамидами (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолы, применяют на растения (например, вредные растения, такие как однодольные или двудольные сорные травы или нежелательные культурные растения), на семена (например, зерно, семена или вегетативные побеги, такие как клубни или ростковые части с почками) или в зоне выращивания растений (например, зоне культивирования). В этом контексте эффективная концентрация одного или большего количества гербицидов, ингибирующих ГФПД, например, одного или большего количества гербицидов, ингибирующих ГФПД, выбранных из группы, включающей гербициды, ингибирующие ГФПД из такого класса, как трикетоны (предпочтительно бензобициклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изоксафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидами, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамидами (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазинона, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолы, может быть применена, к примеру, до посадки (при необходимости путем введения в почву), до всхода или после всхода, и может быть применена в комбинации с другими гербицидами, к которым культура имеет врожденную устойчивость или устойчива через экспрессию одного или более трансгенов устойчивости к гербицидам. См., например, U.S. App. Pub. No. 2004/0058427 и заявку PCT № публ. WO

98/20144. Под "эффективной концентрацией" следует понимать концентрацию, контролирующую рост или распространение сорных трав или других нетрансформированных растений без значительного влияния на устойчивое к ингибитору ГФПД растение или семя. Специалистам в данной области понятно, что применение гербицидов может принимать много различных форм и может иметь место в различное время до и/или во время посева семян и процесса роста. "Довсходовое" применение представляет собой применение гербицида в соответствующем месте (например, поле или площади выращивания) до видимого всхода растения из почвы. "Послевсходовое" применение представляет собой применение гербицида в соответствующем месте после видимого всхода растения из почвы. В некоторых случаях термины "довсходовый" и "послевсходовый" применяют по отношению к сорным травам в соответствующем месте, а в некоторых случаях эти термины применяют по отношению к культурному растению в соответствующем месте. При применении по отношению к сорняку эти термины могут относиться к конкретному типу или виду сорняка, которые находятся или предполагается их наличие в соответствующем месте. "Допосадочное введение" гербицида включает в себя введение соединений в почву до посадки.

Таким образом, настоящее изобретение включает в себя способ борьбы с сорными травами в поле, заключающийся в том, что в поле высаживают растение или его семена, содержащие предлагаемый в настоящем изобретении полипептид ГФПД, и на указанное растение или площадь, окружающую указанное растение, наносят эффективную концентрацию одного или большего количества гербицидов, ингибирующих ГФПД.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения поле, которое должно быть засажено растениями (такими как соевые бобы, хлопчатник, кукуруза, или например растения пшеницы), содержащими нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, может быть обработано гербицидом, ингибирующим ГФПД, таким как изоксафлутол (IFT), до посадки растений или посева семян, что очищает поле от сорных трав, уничтожаемых гербицидом, ингибирующим ГФПД, позволяет использовать практики нулевой обработки почвы, с последующей посадкой или посевом растений на этом же предварительно обработанном поле (контактное применение гербицида, ингибирующего ГФПД). Остаточная активность IFT также будет защищать появляющиеся и растущие растения от конкуренции с сорными травами на ранних стадиях роста. Когда растения достигают определенного размера, и сорные травы как правило, появляются вновь, поверх растений может быть применен глауфосинат или глифосат, или же гербицид, ингибирующий ГФПД или смесь гербицида, ингибирующего ГФПД с другим гербицидом, таким как глифосат, если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, поле, засеянное семенами, содержащими нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, может быть обработано гербицидом, ингибирующим ГФПД, таким как IFT, до появления растений, но после посева семян (поле может быть предварительно очищено от сорных трав другими средствами, обычно стандартными практиками обработки почвы, такими как вспахивание, глубокое вспахивание или подготовка посевных мест), при этом остаточная активность будет поддерживать поле чистым от сорных трав, уничтоженных гербицидом, так что появляющиеся и растущие растения не имеют конкуренции с сорными травами (довсходовое применение гербицида, ингибирующего ГФПД). Когда растения достигают определенного размера, и сорные травы могут появиться вновь, поверх растений может быть применен глауфосинат или глифосат, или же гербицид, ингибирующий ГФПД или смесь гербицида, ингибирующего ГФПД с другим гербицидом, таким как глифосат, если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растения, содержащие нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, могут быть обработаны гербицидом, ингибирующим ГФПД, поверх растений, которые уже появились из высеванных семян, что очищает поле от сорных трав, уничтоженных гербицидом, ингибирующим ГФПД, применение которого можно осуществлять совместно с (например, в баковой смеси для опрыскивания), с последующей или предшествующей обработкой глифосатом или глауфосинатом в качестве послевсходового гербицида поверх растений (послевсходовое применение гербицида, ингибирующего ГФПД (с или без глифосата)), если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

Примеры отдельных представителей однодольных и двудольных сорных трав, с которыми можно вести борьбу при помощи гербицида, ингибирующего ГФПД, включают:

Однодольные вредные растения из родов: *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*, *Avena*, *Brachiaria*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Commelina*, *Cynodon*, *Cyperus*, *Dactyloctenium*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleocharis*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Festuca*, *Fimbristylis*, *Heteranthera*, *Imperata*, *Ischaemum*, *Leptochloa*, *Lolium*, *Monochoria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Rottboellia*, *Sagittaria*, *Scirpus*, *Setaria*, *Sorghum*.

Двудольные вредные растения из родов: *Abutilon*, *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Anoda*, *Anthemis*, *Aphanes*, *Artemisia*, *Atriplex*, *Bellis*, *Bidens*, *Capsella*, *Carduus*, *Cassia*, *Centaurea*, *Chenopodium*, *Cirsium*, *Convolvulus*, *Datura*, *Desmodium*, *Emex*, *Erysimum*, *Euphorbia*, *Galeopsis*, *Galinsoga*, *Galium*, *Hibiscus*, *Ipomoea*, *Kochia*, *Lamium*, *Lepidium*, *Lindernia*, *Matricaria*, *Mentha*, *Mercurialis*, *Mullugo*, *Myosotis*, *Papaver*, *Pharbitis*, *Plantago*, *Polygonum*, *Portulaca*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Rotala*, *Rumex*, *Salsola*, *Senecio*, *Sesbania*, *Sida*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sonchus*, *Sphenoclea*, *Stellaria*, *Taraxacum*, *Thlaspi*, *Trifolium*, *Urtica*, *Veronica*, *Viola*, *Xan-*

thium.

Гербициды, ингибирующие ГФПД, пригодные в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь гербицидами, ингибирующими ГФПД, из такого класса как трикетоны (предпочтительно бензобиклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион), дикетонитрилы, изоксазолы (предпочтительно изокафлутол), гидроксипиразолы (предпочтительно пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды (предпочтительно 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 2"), N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамиды (предпочтительно 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид; 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид (также упоминается в дальнейшем как "Соед. 1"); 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид, производные пиридазина, производные оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамиды, триазины и пиразолоны, могут быть приготовлены в виде составов различными способами, в зависимости от преобладающих биологических и/или физико-химических параметров. Примерами возможных составов являются: смачиваемые порошки (WP), водорастворимые порошки (SP), водорастворимые концентраты, эмульгируемые концентраты (EC), эмульсии (EW), такие как эмульсии типа "масло-в-воде" и "вода-в-масле", распыляемые растворы, суспензионные концентраты (SC), дисперсии на основе масла или воды, смешиваемые с маслом растворы, капсульные суспензии (CS), тонкие порошки (DP), продукты для протравливания семян, гранулы для применения разбрасыванием и на почву, гранулы (GR) в виде микрогранул, гранулы для распыления, покрытые гранулы и адсорбционные гранулы, вододиспергируемые гранулы (WG), водорастворимые гранулы (SG), составы сверхнизкого объема ULV, микрокапсулы и воски.

Эти отдельные типы составов, в принципе, известны и описаны, например, в: Winnacker-Kuchler, "Chemische Technologie" [Химическая технология], том 7, С. Hanser Verlag Munich, 4-е изд. 1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations", Marcel Dekker, N.Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying" Handbook, 3-е изд. 1979, G. Goodwin Ltd. London.

Необходимые вспомогательные средства для составов, такие как инертные вещества, поверхностно-активные вещества растворители и другие добавки, равным образом известны и описаны, например, в: Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers", 2-е изд., Darland Books, Caldwell N.J., H.v. Olphen, "Introduction to Clay Colloid Chemistry"; 2-е изд., J. Wiley & Sons, N.Y.; C. Marsden, "Solvents Guide"; 2-е изд., Interscience, N.Y. 1963; McCutcheon's "Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley and Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", Chem. Publ. Co. Inc., N.Y. 1964; Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Athylenoxidaddukte" [Поверхностно-активные аддукты этиленоксида], Wiss. Verlagsgesell., Штутгарт 1976; Winnacker-Kuchler, "Chemische Technologie" [Химическая технология], том 7, С. Hanser Verlag Мюнхен, 4-е изд. 1986.

На основе этих составов также возможно приготовить комбинации с другими пестицидно активными веществами, такими как, например, инсектициды, акарициды, гербициды, фунгициды, а также с сафенерами, удобрениями и/или регуляторами роста, например, в виде готовых к применению составов или в виде смеси в баке.

М. Способы введения гена в соответствии с изобретением в другое растение.

В настоящем изобретении также представлены способы введения нуклеотидной последовательности ГФПД в соответствии с изобретением в другое растение. Нуклеотидная последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, или ее фрагмент может быть введена в другое растение путем рекуррентной селекции, обратного скрещивания, селекционного разведения, линейной селекции, массовой селекции, мутационного разведения и/или селекции, усиленной генетическим маркером.

Таким образом, в одном варианте осуществления способы в соответствии с изобретением включают в себя скрещивание первого растения, содержащего нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением со вторым растением для получения потомственных растений F1 отбор потомственных растений F1, устойчивых к гербициду, ингибирующему ГФПД или содержащих нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением. Способы могут также включать скрещивание отобранных потомственных растений с первым растением, содержащим нуклеотидную последовательность в соответствии с изобретением, для получения потомственных растений обратного скрещивания и отбор потомственных растений обратного скрещивания, устойчивых к гербициду, ингибирующему ГФПД или содержащих нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением. Способы оценки устойчивости к гербицидам, ингибирующим ГФПД приведены в данной заявке в другом месте. Кроме того, способы могут также включать повторение этих стадий один или несколько раз последовательно для получения отобранных потомственных растений обратного скрещивания второго или последующих поколений, устойчивых к гербициду, ингибирующему ГФПД или содержащих нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением.

В способе в соответствии с настоящим изобретением может быть использован любой метод разведения, включающий селекцию растений по желаемому фенотипу. В некоторых вариантах осуществления

растения F1 могут самоопыляться для получения поколения после расщепления F2. Затем могут быть отобраны отдельные растения, представляющие желаемый фенотип (например, устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД) в каждом поколении (F3, F4, F5 и т.д.) пока признаки не станут гомозиготными или закрепленными внутри популяции для разведения.

Вторым растением может быть растение, обладающее необходимым признаком, таким как устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к засухе, борьба с нематодами, эффективность использования воды, эффективность использования азота, улучшенная питательная ценность, устойчивость к болезням, улучшенный фотосинтез, улучшенное качество волокон, устойчивость к стрессам, улучшенное размножение и т.п. Второе растение может быть элитным событием, как описано в настоящем изобретении в другом месте.

В различных вариантах осуществления части растений (целые растения, органы растений (напр., листья, стебли, корни и т.д.), семена, растительные клетки, побеги, эмбрионы и т.п.) могут быть собраны из полученного однократного скрещивания и или распространены, или собраны для последующего использования для дальнейшего размножения или обработки (такой как производство еды, корма, биотоплива, масла, муки, потребление в пищу и т.п.).

N. Способы получения растительного продукта.

Настоящее изобретение также относится к способу получения товарного продукта, включающего уборку урожая и/или помол зерен культуры, содержащей нуклеотидную последовательность ГФПД в соответствии с изобретением, для получения товарного продукта. АгронOMICESКИ и коммерчески важные продукты и/или композиции, включая, но не ограничиваясь только ними, корм для животных, изделия, а также растительные продукты и побочные продукты, предназначены для использования в качестве продуктов питания для употребления в пищу человеком или для использования в композициях и товарах, предназначенных для потребления человеком, в частности лишенных жизнеспособности семян/зерновых продуктов, в том числе (полу-)обработанных продуктов, полученных из таких зерен/семян, причем указанный продукт является или содержит целые или обработанные семена или зерна, корм для животных, кукурузную или соевую муку крупного помола, кукурузную или соевую муку, кукурузу, кукурузный крахмал, соевую муку крупного помола, соевую муку, хлопья, концентрат соевого белка, изоляты соевого белка, текстурированный концентрат соевого белка, косметические средства, средства по уходу за волосами, соевое ореховое масло, натто, темпе, гидролизированный соевый белок, взбитые сливки, шортенинг, лецитин, съедобные цельные соевые бобы (сырые, жареные или как эдамаме), соевый йогурт, соевый сыр, тофу, юбу, а также приготовленное, шлифованное, обработанное паром, запеченное или пропаренное зерно и т.п., предназначены для включения в настоящее изобретение если эти продукты и композиции содержат обнаружимые количества нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности, изложенной в настоящем изобретении как диагностические для любого растения, содержащего такие нуклеотидные последовательности.

Ниже следующие примеры приведены в иллюстративных целях, а не для ограничения.

Экспериментальная часть

Обзор.

Пример 1. Создание мутировавших полипептидов ГФПД путем сайт-направленного мутагенеза.

Пример 2. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных полипептидов ГФПД дикого типа и мутантных полипептидов ГФПД.

Пример 3. Ферментный анализ ГФПД для анализа мутантных полипептидов ГФПД с улучшенной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Пример 4. Улучшенная устойчивость к гербицидам, опосредованная обменами остатков в полипептидах ГФПД.

Пример 5. Анализ коричневого цвета для тестирования мутантных полипептидов ГФПД, устойчивых к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Пример 6. Трансформация соевых бобов и устойчивость растений T0 соевых бобов.

Пример 7. Создание и отбор растения хлопчатника T0.

Пример 8. Трансформация растительных клеток маиса путем опосредованной *Agrobacterium* трансформации.

Пример 9. Устойчивость растений соевых бобов T1 к гербицидам, ингибирующим ГФПД/полевые испытания.

Пример 1. Создание мутировавших полипептидов ГФПД путем сайт-направленного мутагенеза.

Нуклеотидную последовательность ГФПД *Pseudomonas fluorescens* (SEQ ID NO: 109), как описано в WO 2009/144079, кодирующую полипептид ГФПД, соответствующий SEQ ID NO: 1 клонировали в соответствии с хорошо известными способами из уровня техники и, как описано в WO 2014/043435. Последующий сайт-насыщенный мутагенез, сайт-направленный мутагенез и комбинаторные варианты с одной или несколькими мутациями нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательности полипептида PflNPPD дикого типа, кодирующей рекомбинантный полипептид ГФПД, соответствующий SEQ ID NO: 1 осуществляли с применением стандартного метода на основе ПЦР технологий, хорошо известных в уровне техники (и как описано в WO2014/043435). Все разработанные и синтезированные мутантные

клоны были подтверждены секвенированием ДНК с использованием плазмидных специфических олигонуклеотидов. В табл. 2 ниже приведены примерные мутантные полипептиды ГФПД (SEQ ID NO: 2 -SEQ ID NO: 108).

Таблица 2

Обзор примерных аминокислотных обменов, соответствующих положению аминокислоты в SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO:	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1																
	204	213	264	268	270	310	315	330	331	335	336	337	338	339	340	344	345
1	A	R	M	P	T	Q	T	D	D	E	G	N	F	K	A	S	I
2										P	W			A	Q		
3										P							
4												S					
5										P		S					
6										P	D						
7										P	D	S					
8										P	D	S			V		
9										P	D	S					V
10										P	D	S			V		V

11								H		P	D	S					
12								H		P	D	S			V		
13								H		P	D	S					V
14								H		P	D	S			V		V
15				S	S					P	D	S			V		V
16				S	S					P	D	S			V		K
17				G	E					P	D	S			V		V
18			R					H		P	D	S			V		
19			R	G	E			H		P	D	S			V		V
20										P	H						
21										P	H	S					
22										P	H	S			V		
23										P	H	S					V
24										P	H	S			V		V
25								H		P	H	S					
26								H		P	H	S			V		
27								H		P	H	S					V
28								H		P	H	S			V		V
29				S	S					P	H	S			V		V
30				S	S					P	H	S			V		K
31				G	E					P	H	S			V		V
32				R	E					P	H	S			V		V
33				G	E					P	D	S			R		V
34				G	E			H		P	D	S			R		K
35				G	E					P	D	S			R		K
36			R	G	E			H		P	D	S			V		M
37				G	R			H		P	D	S			V		K
38				G	E			V		P	D	S			V		V
39	L			G	E					P	D	S			V		V
40	M			G	E					P	D	S			V		V
41	S			G	E					P	D	S			V		V
42	T			G	E					P	D	S			V		V
43		K		G	E					P	D	S			V		V
44		L		G	E					P	D	S			V		V
45				G	E			R		P	D	S			V		V
46				G	E			M		P	D	S			V		V
47				G	E			H		P	D	S			V		V
48				G	E				H	P	D	S			V		V
49				G	E				I	P	D	S			V		V
50				G	E				P	P	D	S			V		V
51				G	E				L	P	D	S			V		V

52				G	E				S	P	D	S			V		V
53				G	E					P	D	S	V		V		V
54				G	E					P	D	S		A	V		V
55				G	E					P	D	S		E	V		V
56				G	E					P	D	S		R	V		V
57				G	E					P	D	S		T	V		V
58				G	E					P	D	S			V	P	V
59				G	E					P	D	S			V	R	V
60			R	G	E			H		P	D	S			V	Q	V
61			R	G	E			H		P	D	S			V	P	V
62			R	G	E			H		P	D	S			V	R	V
63				G						P	D	S			V		V
64				G	E	H				P	D	S			V		V
65				G	E	K				P	D	S			V		V
66				G	E	S				P	D	S			V		V
67			K	G	E					P	D	S			V		V
68			L	G	E					P	D	S			V		V
69			Q	G	E					P	D	S			V		V
70			R	G	E					P	D	S			V		V
71				E						P	D	S			V		V
72				R	E					P	D	S			V		V
73				S	E					P	D	S			V		V
74				G	L					P	D	S			V		V
75				G	P					P	D	S			V		V
76				G	R					P	D	S			V		V
77				G	S					P	D	S			V		V
78				G	E			A		P	D	S			V		V
79				G	E			F		P	D	S			V		V
80				G	E			G		P	D	S			V		V
81				G	E					P	D	S					V
82				G	E					P	D	S			E		V
83				G	E					P	D	S			G		V
84				G	E					P	D	S			L		V
85				G	E					P	D	S			M		V
86				G	E					P	D	S			Q		V
87				G	E					P	D	S			V		A
88				G	E					P	D	S			V		
89				G	E					P	D	S			V		K
90				G	E					P	D	S			V		M
91				G	E					P	D	S			V		R
92			R	G	E			H		P	D	S			V		A
93			R	G	E			H		P	D	S			V		
94			R	G	E			H		P	D	S			V		K
95			R	G	E			H		P	D	S			V		R
96			K	G	E					P	H	S			V		V
97				G	R			H	S	P	D	S			V		K
98				G	E			H	S	P	D	S			R		K
99				G	E					P	D	S	V		R		V
100			L	G	E			H		P	D	S			V	Q	M
101			L	G	E			R		P	D	S			V	Q	M
102			L	R	E			R		P	H	S			V	Q	M
103			K	L	G	E		R		P	H	S			V	Q	M
104			K	L	G	E				P	H	S			V	Q	M
105			K	L	G	E				P	H	S			R	Q	M
106			L	G	E			H	P	P	D	S			V	Q	M
107			K	G	E					P	H	S	V		R		V
108				G	E			M	H	P	D	S			V		M

Для ясности пустые клетки в соответствующем положении аминокислоты в SEQ ID NO: 2 - NO: 108 определены как идентичные аминокислотам, соответствующим SEQ ID NO: 1, выделяя только обмены в мутантных полипептидах ГФПД. Представленные здесь мутантные полипептиды ГФПД являются примерами путем иллюстрации, а не путем ограничения.

Пример 2. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных полипептидов ГФПД дикого типа и мутантных.

Все полученные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие ГФПД дикого типа и мутантную, кодирующие рекомбинантный полипептид ГФПД, были клонированы, продуцированы и очищены с использованием способов, хорошо известных в уровне техники (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., CSH Laboratory Press, 2001, Cold Spring Harbor, NY). Все полученные кодирующие последовательности нуклеиновых кислот были клонированы в pSE420(RI)NX, слитый с N-концевой His-меткой (кодирующей аминокислотную последовательность M1-A2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-), как описано в WO 2014/043435, и экспрессировали в штамме *Escherichia coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs, Франкфурт, Германия). Для ясности все перечисленные положения с соответствующими аминокислотными обменами из мутантных полипептидов ГФПД HPPD в табл. 1-5, и табл. 7, соответствующие SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 108 в настоящем изобретении, относятся к аминокислотной последовательности природной ГФПД дикого типа без N-концевой His-метки, соответствующей SEQ ID NO: 1.

Для создания образцов очищенного полипептида ГФПД, клетки выращивали в течение 3 ч при 37°C в 5 мл среды ЛБ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина в 50 мл смесительной колбе с 140 об/мин. Один мл этой исходной культуры использовали в качестве инокулята для культуры экспрессии. Клетки выращивали в течение приблизительно 3 ч при 37°C в 100 мл среды ЛБ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 150 мМ Nepes (Merck, Дармштадт, Германия) в 500 мл смесительной колбе с 120 об/мин. При OD600 приблизительно в 0.6, IPTG (Roth, Карлсруэ, Германия) добавляли до концентрации в 0.4 мМ. После дальнейшего роста в течение 60 мин. при 37°C, температура была снижена до 28°C и рост продолжился в течение еще 18 ч с 140 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 4°C, 3200 g в течение 30 мин в 50 мл пробирках Falcon и сгусток клеток хранили при -80°C. Клетки подвергали лизированию и his-меченый белок очищали в соответствии с протоколом производителя используемого Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Хильден, Германия) с последующими приспособлениями для повышения урожайности: клетки из 50 мл культуры лизировали в 4 мл и супернатант лизата получали путем центрифугирования в течение 15 мин при 18000 g. Количество матрицы в колонках было увеличено добавлением 1 мл NiNTA Superflow (Qiagen, Хильден, Германия) каждый и тщательно повторно забуферивали в 20 мМ Tris (pH 7.6) (Merck, Дармштадт, Германия). Применяли супернатант лизата, а His-меченный белок связывали с матрицей Ni-NTA путем инкубации в течение 1 ч при 4°C.

Полученные образцы белка повторно забуферивали в 20 мМ Tris, 20% глицерина (pH 7.8) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) путем применения колонок Zeba™ Spin Desalting, 7K MWCO, 10 мл (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и анализировали на концентрацию и чистоту белка посредством Abs280 (NANODROP 8000, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и SDS-PAGE. Концентрации очищенных белков обычно находились в диапазоне 0.6 - 4.6 мг/мл по расчетной чистоте приблизительно в 90%.

Для получения неочищенного экстракта полипептида ГФПД в микротитрационных планшетах (МТП) для определения остаточной активности в анализах на ингибирование, клетки выращивали в 40 или 150 мкл среды ЛБ, содержащей 1% глюкозу (Merck, Дармштадт, Германия) и 100 мкг/мл ампициллина в стандартном 96-луночном планшете (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) инкубировали в течение приблизительно 18 ч. в инкубаторе с влажностью при 37°C.

30 мкл этой исходной культуры добавляли в 600 мкл среды ЛБ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 150 мМ Nepes (Merck, Дармштадт, Германия) в качестве инокулята для культуры экспрессии в 96-луночных планшетах (лунки глубиной 2 мл; NJ Bioanalytik, Эркеленц, Германия). Планшеты герметизировали алюминиевой фольгой и клетки инкубировали в течение 5 ч при 37°C на встряхивателе для планшетов с 750 об/мин. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 1 мМ, после чего следовала дальнейшая герметичная инкубация в течение приблизительно 18 ч при 30°C на встряхивателе для планшетов с 750 об/мин.

Клетки собирали центрифугированием при 4°C, 2500 g в течение 15 мин, отбрасывая супернатант. Сгусток клеток хранили при -80°C и лизировали в 250 мкл 1x BugBuster® (Merck, Дармштадт, Германия) в 140 мМ Tris (pH 7.8), с 1: 25000 разбавленной BNase® (Qiagen, Хильден, Германия) путем инкубации ресуспендированных клеток в течение 30 мин при 4°C и 1000 об/мин. Лизаты осветляли центрифугированием в течение 15 мин. при 4°C, 2500 g, и 150 мкл супернатанта переносили в стандартный 96-луночный планшет (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) для последующего тестирования в квадратах.

Пример 3. Ферментный анализ ГФПД для анализа мутантных полипептидов ГФПД с улучшенной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Активность полипептидов ГФПД определяли в отсутствие или в присутствии ингибиторов ГФПД с применением связанного анализа активности ГФПД (фиг. 1).

Для определения остаточной активности кажущуюся кинетическую константу (k_{app}) определенной конверсии субстрата измеряли как кинетические изменения поглощения при 320 нм в связанном анализе, поскольку гомогенизат (ГГ), образованный посредством ГФПД из ГФП непосредственно превращается в хорошо поглощающую молекулу малеилацетоацетата (МАО) при помощи второго фермента гомогенизатдиоксигеназы (HGD), применяемой в избытке постоянно во всех анализах (см. фиг. 1). Измерения осуществляли в 384 микротитрационных планшетах (Greiner Bio-One GmbH, Фрикенхаузен, Германия) с помощью считывателей пластин (Tecan infinite M1000 или M1000PRO, Tecan, Мэннедорф, Швейцария). Соотношение k_{cat}/k_M ферментативной активности пропорционально кажущейся кинетической константе k_{app} и пропорционально $k_{cat}/k_M * [E]$ ($[E]$ = концентрация фермента). Конкурентоспособный ингибитор проявляет кажущееся увеличение k_M и, следовательно, обратное уменьшение k_{app} при не насыщающихся концентрациях субстрата. Поскольку оба измерения k_{app} в присутствии и в отсутствии ингибитора осуществляли с использованием идентичного образца фермента, неочищенного или очищенного и, таким образом, при той же концентрации фермента, концентрация фермента исключена из расчета остаточной активности и соотношение обоих k_{app} непосредственно указывает на изменение k_M вследствие ингибирования. Примечательно, что эта концепция относится к парам фермент/ингибитор, взаимодействуя в режиме "конкурентного ингибирования", вероятно правильно для почти всех вариантов полипептидов и ингибиторов, описанных в настоящем изобретении, но, безусловно, не относится к полипептиду дикого типа, который ингибируется необратимо (для сравнения см. WO 2014/043435, фиг. 2 и 3). Следовательно, остаточная активность полипептида ГФПД дикого типа, относящаяся к "конкурентному ингибированию" и значениям k_i не может быть рассчитана правильно, тем не менее, с целью иллюстрации, необоснованные значения приведены в табл. 3 для полипептида ГФПД дикого типа, которые рассчитывают путем первоначальных изменений сигнала до того, как произойдет необратимое ингибирование.

Аналитический раствор, используемый для определения остаточной активности в сырых образцах полипептида ГФПД, состоял из 200 мМ фосфата натрия (Merck, Дармштадт, Германия, pH 7.0), 5 мМ $MgCl_2$ (Merck, Дармштадт, Германия), 20 мМ аскорбата (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), 1 мМ DTT (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), 0.1% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), 40 мкМ $FeSO_4$ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), приблизительно 8 мг/мл очищенного HGD и низких или высоких концентраций субстрата ГФП (100 или 400 мкМ) из 1 М исходного раствора в ДМСО (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) и уравнивали в течение 20 мин. на льду. Для каждого образца полипептида ГФПД осуществляли два анализа в квадруплетах, посредством чего 5 мкл образца полипептида ГФПД сначала смешивали с 5 мкл буфера (1x BugBuster®; (Merck, Дармштадт, Германия); в 140 мМ Tris, pH 7.8, с 1 : 25000 разбавленной BNase®; Qiagen, Хильден, Германия) или 5 мкл ингибитора, разбавленного в том же буфере из 0.1 М исходного раствора в ДМСО (30, 100 или 120 мкМ, что приводит к 15, 50 и 60 мкМ в образце полипептид ГФПД/ингибитор) в контрольном и ингибирующем анализе, соответственно, и затем с 10 мкл аналитического раствора. Изменение оптической плотности при 320 нм проводили с интервалами в 1 мин в течение 30 мин. Значения k_{app} подсчитывали как наклон сигнала с течением времени на ранней фазе кинетической реакции, обычно для первых 5-10 минут измерений (сравн. фиг. 3). Дополнительно и в соответствии с рассчитанной остаточной активностью, полную конверсию, т.е. абсолютное изменение сигнала, за 30 мин интервал времени контролировали как показатель оборота, а остаточный оборот рассчитывали путем деления изменения сигнала в присутствии ингибитора на изменение сигнала в эталонном образце без ингибитора.

Аналитические растворы, используемые для определения значений k_i , были составлены таким же образом и содержали шесть различных концентраций субстрата ГФП (0 - 1350 мкМ) для каждой из четырех тестируемых концентраций ингибитора. Ингибиторы разводили в 140 мМ Tris, 0.05% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) и применяли в концентрациях, принятых для соответствующих пар полипептид ГФПД/ингибитор для создания динамических данных (фиг. 4 а-г); как правило, их концентрации в образце полипептид ГФПД/ингибитор находились в диапазоне от 0 до 0.0012 М.

Пример 4. Улучшенная устойчивость к гербицидам, опосредованная обменов остатков в полипептидах ГФПД.

Когда переносимость мутантных полипептидов ГФПД определяли к различным доступным химическим классам гербицидов, ингибирующих ГФПД (трикетоны, изоксазолы, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамиды, или N-(тетразол-5-ил)-арилкарбоксамиды), то стало очевидно, что некоторые из новых вариантов осуществления настоящего изобретения не только значительно улучшены по сравнению с эталонной ГФПД дикого типа (SEQ ID NO: 1), но также неожиданно лучше, чем известные из уровня техники мутантные полипептиды ГФПД (как, например, те, которые описаны в WO 2014/043435) с SEQ ID NO: 2 в этом изобретении в качестве примера.

Как указано в табл. 3, мутантные полипептиды ГФПД из предшествующего уровня техники (WO 2014/043435), соответствующие SEQ ID NO: 2 в этом изобретении содержат обмены остатков в положениях 335, 336, 339 и 340.

На основе мутантного полипептида ГФПД, содержащего 335 (E=>P), 336 (G=>D/H), 337 (N=>S), введение дополнительных обменов остатков в положениях 264, 268, 270, 330, 340 и/или 345, продуцируе-

ных мутантные полипептиды ГФПД, демонстрирующих существенно улучшенную устойчивость (табл. 3), в отношении многих примененных ингибиторов ГФПД, относящихся к различным химическим классам.

Соответственно, изобретатели создали и оценили новые мутантные полипептиды ГФПД путем комбинаторных обменов остатков в положении 335 (глутаминовая кислота => пролин), 336 (глицин => аспарагиновая кислота / гистидин), 337 (аспарагин => серин) и, необязательно, дополнительно включающие обмены в положениях 204, 213, 264, 268, 270, 310, 315, 330, 331, 338, 339, 340, 344 и/или 345 (табл. 3, 4 и 5), которые демонстрируют улучшенные остаточные активности, более высокий остаточный оборот, более высокие значения k_i и тем самым значительно более высокую устойчивость к гербицидам. В зависимости от тестируемого гербицида, ингибирующего ГФПД, уровень улучшения может различаться в отношении полипептидов ГФПД, применяемых в таком анализе, с уровнем от 1.5 до 110 раз, по сравнению с SEQ ID NO: 2 (табл. 4).

Анализ периода действия ингибирования против различных химических классов гербицидов, ингибирующих ГФПД, показал, что гербициды, ингибирующие ГФПД, по-видимому, являются обратимыми ингибиторами против новых мутантных полипептидов ГФПД, в отличие от медленного и прочно связывающего ингибитора, характерного для полипептида ГФПД дикого типа, соответствующего SEQ ID NO: 1 (см. фиг. 2 и 3). Такое поведение обеспечивает лучший и универсальный потенциал для устойчивости в сельскохозяйственных растениях к различным гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Для высокой остаточной активности в присутствии гербицидов, ингибирующих ГФПД, раскрытые положения и изменения остатков выделены в табл. 1 относительно положения аминокислоты в полипептиде ГФПД, соответствующем SEQ ID NO: 1 в настоящем изобретении представлены как важные.

Таблица 3. Устойчивость мутантных полипептидов ГФПД к различным гербицидам, ингибирующим ГФПД, принадлежащим к разным химическим классам.

Таблица 3а

Остаточная активность и оборот в присутствии соед. 1 в соответствии с примером 3 при высокой концентрации субстрата и 15 мкМ ингибитора

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1										Остаточная активность	Остаточный оборот
	264	268	270	330	335	336	337	339	340	345		
1	M	P	T	D	E	G	N	K	A	I	6%	6%
2					P	W		A	Q		39%	50%
3					P						9%	9%
4							S				13%	12%
5					P		S				20%	24%
7					P	D	S				27%	38%
8					P	D	S		V		21%	44%
9					P	D	S			V	36%	51%
10					P	D	S		V	V	41%	66%
11				H	P	D	S				24%	30%
12				H	P	D	S		V		43%	55%
13				H	P	D	S			V	35%	40%
14				H	P	D	S		V	V	44%	60%
15		S	S		P	D	S		V	V	46%	74%
16		S	S		P	D	S		V	K	45%	69%
17		G	E		P	D	S		V	V	43%	68%
18	R			H	P	D	S		V		67%	79%
19	R	G	E	H	P	D	S		V	V	68%	79%
20					P	H					14%	16%
21					P	H	S				18%	30%
22					P	H	S		V		26%	53%
23					P	H	S			V	26%	36%
24					P	H	S		V	V	28%	57%
25				H	P	H	S				33%	37%
26				H	P	H	S		V		55%	65%

27			H	P	H	S		V	36%	42%
28			H	P	H	S		V V	45%	57%
29	S	S		P	H	S		V V	33%	59%
30	S	S		P	H	S		V K	39%	65%
31	G	E		P	H	S		V V	40%	67%

Таблица 3b

Остаточная активность и оборот в присутствии соед. 2 в соответствии с примером 3 при высокой концентрации субстрата и 15 мкМ ингибитора

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1										Остаточная активность	Остаточный оборот
	264	268	270	330	335	336	337	339	340	345		
1	M	P	T	D	E	G	N	K	A	I	8%	8%
2					P	W		A	Q		51%	72%
3					P						16%	22%
4							S				18%	17%
5					P		S				36%	53%
7					P	D	S				75%	83%
8					P	D	S		V		67%	74%
9					P	D	S			V	79%	89%
10					P	D	S		V	V	89%	н.о.
11				H	P	D	S				59%	67%
12				H	P	D	S		V		93%	н.о.
13				H	P	D	S			V	82%	88%
14				H	P	D	S		V	V	82%	92%
15		S	S		P	D	S		V	V	90%	н.о.
16		S	S		P	D	S		V	K	94%	94%
17		G	E		P	D	S		V	V	90%	90%
18	R			H	P	D	S		V		н.о.	н.о.
19	R	G	E	H	P	D	S		V	V	92%	93%
20					P	H					31%	50%
21					P	H	S				73%	84%
22					P	H	S		V		90%	н.о.
23					P	H	S			V	76%	83%
24					P	H	S		V	V	90%	н.о.
25				H	P	H	S				82%	83%
26				H	P	H	S		V		92%	95%
27				H	P	H	S			V	80%	86%
28				H	P	H	S		V	V	83%	93%
29		S	S		P	H	S		V	V	85%	н.о.
30		S	S		P	H	S		V	K	95%	н.о.
31		G	E		P	H	S		V	V	95%	н.о.

Таблица 3с

Остаточная активность и оборот в присутствии мезотриона (MST) в соответствии с примером 3 при высокой концентрации субстрата и 60 мкМ ингибитора

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1										Остаточная активность	Остаточный оборот
	264	268	270	330	335	336	337	339	340	345		
1	M	P	T	D	E	G	N	K	A	I	6%	8%
2					P	W		A	Q		71%	85%
3					P						13%	17%
4							S				16%	15%
5					P		S				46%	71%
7					P	D	S				70%	85%
8					P	D	S		V		70%	85%
9					P	D	S			V	71%	86%
10					P	D	S		V	V	82%	н.о.
11				H	P	D	S				64%	85%
12				H	P	D	S		V		80%	94%
13				H	P	D	S			V	72%	88%
14				H	P	D	S		V	V	70%	89%
15		S	S		P	D	S		V	V	83%	94%
16		S	S		P	D	S		V	K	88%	92%
17		G	E		P	D	S		V	V	85%	90%
19	R	G	E	H	P	D	S		V	V	51%	78%
20					P	H					25%	40%
21					P	H	S				62%	89%
22					P	H	S		V		77%	99%
23					P	H	S			V	63%	79%
24					P	H	S		V	V	51%	68%
25				H	P	H	S				70%	87%
26				H	P	H	S		V		81%	92%
27				H	P	H	S			V	64%	82%
28				H	P	H	S		V	V	66%	84%
29		S	S		P	H	S		V	V	79%	95%
30		S	S		P	H	S		V	K	87%	н.о.
31		G	E		P	H	S		V	V	83%	н.о.

Таблица 3d

Остаточная активность и оборот в присутствии дикетонитрила (DKN) в соответствии с примером 3 при высокой концентрации субстрата и 60 мкМ ингибитора

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1										Остаточная активность	Остаточный оборот
	264	268	270	330	335	336	337	339	340	345		
1	M	P	T	D	E	G	N	K	A	I	7%	8%
2					P	W		A	Q		86%	93%
3					P						17%	17%
4							S				17%	14%
5					P		S				41%	47%
7					P	D	S				79%	92%
8					P	D	S		V		91%	95%
9					P	D	S			V	90%	92%
10					P	D	S		V	V	н.о.	н.о.
11				H	P	D	S				81%	95%
12				H	P	D	S		V		н.о.	н.о.
13				H	P	D	S			V	н.о.	н.о.
14				H	P	D	S		V	V	91%	н.о.
15		S	S		P	D	S		V	V	н.о.	н.о.
16		S	S		P	D	S		V	K	н.о.	н.о.
17		G	E		P	D	S		V	V	н.о.	95%
18	R			H	P	D	S		V		н.о.	н.о.
19	R	G	E	H	P	D	S		V	V	н.о.	н.о.
20					P	H					37%	40%
21					P	H	S				81%	н.о.
22					P	H	S		V		н.о.	н.о.
23					P	H	S			V	83%	87%
24					P	H	S		V	V	93%	н.о.
25				H	P	H	S				н.о.	н.о.
26				H	P	H	S		V		н.о.	н.о.
27				H	P	H	S			V	92%	н.о.
28				H	P	H	S		V	V	90%	95%
29		S	S		P	H	S		V	V	94%	н.о.
30		S	S		P	H	S		V	K	н.о.	н.о.
31		G	E		P	H	S		V	V	н.о.	н.о.

Остаточная активность и остаточный оборот были определены в соответствии с примером 3 путем измерения k_{app} и общего изменения сигнала, соответственно, в присутствии и в отсутствие (а) соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид), (б) соед. 2 (2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид), (в) мезотрион (MST), и (д) дикетонитрил (DKN). Для каждого мутантного полипептида ГФПД, k_{app} и полное изменение сигнала без гербицидов, ингибирующих ГФПД, служили для нормализации k_{app} и полного изменения сигнала в присутствии гербицида. Суммированные полученные "%-значения" в соответствующих таблицах 3a), 3b), 3c) и 3d) являются средствами двух независимых экспериментов со средним стандартным отклонением 5%. Реакцию проводили при высоких концентрациях субстрата с соед. 1 и соед. 2 при концентрации 15 мкМ и других двух гербицидах (DKN, MST) в концентрации 60 мкМ. Для ясности, пустые клетки в соответствующем положении аминокислоты в SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 108 определены как идентичные аминокислотам, соответствующим SEQ ID NO: 1, выделяя только обмены в варианте полипептида ГФПД. Сокращение "н.о." означает, что в данных условиях не наблюдалось ингибирование, т.е. k_{app} или полное изменение сигнала в присутствии ингибитора не уменьшалось по сравнению с соответствующим значением в отсутствие ингибиторов.

Мутантные полипептиды ГФПД, соответствующие SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 24 с обменами аминокислотами в положениях 335, 336, 337, 340 и 345 относительно полипептида ГФПД в соответствии с SEQ ID NO: 1, в присутствии различных протестированных ингибиторов ГФПД проявляют значительное улучшение в отношении остаточной активности и остаточных оборотов (табл. 3a-d). Изображенная устойчивость к гербицидам SEQ ID NO: 10 показывает не только улучшение по сравнению с полипептидом ГФПД дикого типа (SEQ ID NO: 1), но также и по сравнению с мутантным полипептидом ГФПД из

уровня техники (WO 2014/043435), соответствующим SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении на всех четырех изображенных разных классах гербицидов.

Дальнейшие улучшения устойчивости к ингибитору ГФПД очевидны в вариантах с обменами остатков в раскрытых положениях аминокислот 268 и 270.

Исходя из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 31 отличаются только в указанных положениях 268 и 270. Эти изменения значительно увеличивают остаточный оборот в присутствии ингибитора ГФПД Соед.1 и MST (табл. 3а и 3с), и сохраняют уже достигнутый высокий остаточный оборот в присутствии Соед. 2 (табл. 3б) и DKN (табл. 3д). Эти результаты можно также увидеть вследствие значительно улучшенных значений k_i SEQ ID NO: 31 (табл. 4) по сравнению с полипептидом ГФПД (SEQ ID NO: 1), и мутантным полипептидом ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435), соответствующему SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении.

Исходя из мутантного полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 8, дальнейшее изменение положения аминокислоты 330 (см. SEQ ID NO: 12) демонстрирует дополнительную улучшенную устойчивость к ингибитору ГФПД (см. табл. 3)

Исходя из мутантного полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 12, дальнейшее изменение положения аминокислоты 264 (см. SEQ ID NO: 18) демонстрирует дополнительную улучшенную устойчивость к ингибитору ГФПД к соед. 1 и соед. 2 (см. табл. 3а, 3б).

При введении всех вышеупомянутых обменов в четырех положениях 264, 268, 270, 330 поверх мутантного полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 10, приводя к SEQ ID NO: 19, обнаруживали наиболее сильную устойчивость всех изображенных полипептидов в табл. 3а с остаточной активностью и оборотом в 68% и 79% к соед. 1, демонстрирующую важность обменов комбинаторных остатков в раскрытых положениях аминокислот. Также мутантный полипептид ГФПД, соответствующий SEQ ID NO: 19, имеет улучшенные значения k_i для соед. 1 и соед. 2 (табл. 4) по сравнению с SEQ ID NO: 2.

Таблица 4

Оценка устойчивости мутировавших полипептидов ГФПД к разным гербицидам, ингибирующим ГФПД, принадлежащим к разным химическим классам путем определения значений k_i

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1															Соед. 1 k_i [мкМ]	Соед. 2 k_i [мкМ]	MST k_i [мкМ]
	213	264	268	270	315	330	331	335	336	337	338	339	340	344	345			
1	R	M	P	T	T	D	D	E	G	N	F	K	A	S	I			
2								P	W			A	Q			1	3	22
8								P	D	S			V			4.8	90	72
17			G	E				P	D	S			V	V		19	190	130
31			G	E				P	H	S			V	V		25	120	75
32			R	E				P	H	S			V	V		41	110	120
33			G	E				P	D	S			R	V		17	100	85
34			G	E		H		P	D	S			R	K		21	89	120
35			G	E				P	D	S			R	K		88	160	150
16			S	S				P	D	S			V	K		9.5	180	150
18		R				H		P	D	S			V			19	190	34
19		R	G	E		H		P	D	S			V	V		33	180	35
36		R	G	E		H		P	D	S			V	M		39	120	39
37			G	R		H		P	D	S			V	K		12	76	81
38			G	E		V		P	D	S			V	V		74	170	490
45			G	E	R			P	D	S			V	V		9.7	110	120
48			G	E			H	P	D	S			V	V		39	160	210
50			G	E			P	P	D	S			V	V		47	130	140
60		R	G	E		H		P	D	S			V	Q	V	24	130	32
96	K		G	E				P	H	S			V	V		19	98	93
97			G	R		H	S	P	D	S			V	K		17	86	130
98			G	E		H	S	P	D	S			R	K		33	40	150
99			G	E				P	D	S	V		R	V		100	160	150
100		L	G	E		H		P	D	S			V	Q	M	100	120	120
101		L	G	E	R			P	D	S			V	Q	M	45	96	89
102		L	R	E	R			P	H	S			V	Q	M	40	230	290

103	K	L	G	E	R			P	H	S			V	Q	M	24	260	280
104	K	L	G	E				P	H	S			V	Q	M	43	370	270
105	K	L	G	E				P	H	S			R	Q	M	140	270	100
106		L	G	E		H	P	P	D	S			V	Q	M	95	240	120
107	K		G	E				P	H	S	V		R		V	110	190	100
108			G	E	M	H		P	D	S			V		M	33	150	98

Для ясности, пустые клетки в соответствующем аминокислотном положении в SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 108 определяют как идентичные аминокислотам, соответствующим SEQ ID NO: 1, выделяя только обмены в мутантных полипептидах ГФПД. Представленные в настоящем изобретении мутантные полипептиды ГФПД являются примерами в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Данные были получены путем измерения начальных скоростей реакции с увеличением концентраций соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид), соед. 2 (2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид), и мезотрион (MST) в соответствии с примером 3. Как правило, применяли шесть различных концентраций субстрата ГФП (0 - 1350 мкМ) и четыре различные концентрации соответствующего ингибитора (см. фиг. 4). Концентрации ингибитора были приняты для соответствующих пар ГФПД/ингибитора полипептид для создания динамических данных, т.е. варианты с более низкой устойчивостью анализировали в диапазоне более низких концентраций ингибитора, а концентрации до 1200 мкМ использовали для вариантов с устойчивостью, доведенной до максимума. GraphPad Prism (версия 6.00 для Windows, GraphPad Software, La Jolla Калифорния США) использовали для анализа данных и подгонки кинетических констант, применяющих ограничения в соответствии с конкурентным режимом ингибирования. Там, где происходили явные выбросы, или активности, полученные при очень высоких концентрациях субстрата, не соответствовали математическим методам, лежащим в основе конкурентного режима ингибирования, соответствующие значения были исключены из подгонки.

Некоторые результаты систематических вариантов, созданных на основе двух уже значительно улучшенных мутировавших полипептидов ГФПД SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 приведены в табл. 5.

SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 различаются в двух положениях аминокислот, и SEQ ID NO: 17 показывает ~20-кратное, SEQ ID NO: 19 ~30-кратное увеличение k_i по отношению к соед. 1 по сравнению с мутантным полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO: 2 (см. табл. 4).

Мутантный полипептид ГФПД, соответствующий SEQ ID NO: 17 имеет обмены остатков в положениях 268, 270, 335, 336, 337, 340 и 345 и проявляет 29% остаточную активность, а оборот субстрата снижается всего на 46% в присутствии 50 мкМ соед. 1. Реверсирование остатков в положениях 268, 270, 340, 345 в соответствующий остаток дикого типа (согласно SEQ ID NO: 1) сопровождается падением устойчивости до 19, 24, 17 и 20% остаточной активности, соответственно (табл. 5; SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 88, соответственно), придавая особое значение выгодным свойствам этих положений и мутаций.

Соответственно, реверсия остатка Валин в положении 345 в SEQ ID: 19 к соответствующему остатку дикого типа изолейцин сопровождается падением остаточной активности с 67 до 57% (табл. 5; SEQ ID NO: 93).

С другой стороны, введение дополнительных единичных остаточных обменов в SEQ ID: 17 в положениях 204, 213, 264, 310, 315, 330, 331, 338, 339 или 344 приводило для каждого положения в по меньшей мере одном варианте с дальнейшей значительно увеличенной остаточной активностью более чем 38%, например, A204M (SEQ ID NO: 40), R213L (SEQ ID NO: 44), M264K (SEQ ID NO: 67), Q310K (SEQ ID NO: 65), T315R (SEQ ID NO: 45), D330V (SEQ ID NO: 38), D331I (SEQ ID NO: 49), F338V (SEQ ID NO: 53), K339E (SEQ ID NO: 55) и S344P (SEQ ID NO: 58).

В итоге, специфические дополнительные обмены остатков вне мутаций 335 (глутаминовая кислота (E) => пролин (P)), 336 (глицин (G) => аспарагиновая кислота (D) / гистидин (H)) и 337 (аспарагин (N) => серин (S)) в полипептидах ГФПД обеспечивают улучшение устойчивости к гербицидам и демонстрируют дополнительную важность раскрытых положений 204, 213, 264, 268, 270, 310, 315, 330, 331, 338, 339, 340, 344, 345, придавая улучшенную устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД (табл. 5). Наконец, комбинация этих раскрытых положений приводит к улучшениям k_i по различным классам ингибиторов ГФПД, как показано в табл. 4 (например, SEQ ID NO: 99, 100, 105, и 107) к соед. 1 с более чем 100-кратным, к соед. 2 с до 90-кратным, и в то же время до ~7-кратными улучшениями против мезотриона (MST) по сравнению с полипептидом ГФПД дикого типа (SEQ ID NO: 1) и мутантным полипептидом ГФПД из известного уровня техники (WO 2014/043435), соответствующим SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении.

Таблица 5

Эффект единичных обменов остатков в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19, проанализированный в соответствии с примером 3 при низкой концентрации субстрата и 50 мкМ ингибитора соедин. 1

SEQ ID NO	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1														Остаточная активность	Остаточный оборот			
	204	213	264	268	270	310	315	330	331	335	336	337	338	339			340	344	345
17				G	E					P	D	S			V		V	29%	54%
31				G	E					P	H	S			V		V	50%	81%
39	L			G	E					P	D	S			V		V	34%	61%
40	M			G	E					P	D	S			V		V	65%	77%
41	S			G	E					P	D	S			V		V	54%	77%
42	T			G	E					P	D	S			V		V	59%	87%
43		K		G	E					P	D	S			V		V	28%	61%
44		L		G	E					P	D	S			V		V	58%	78%
67			K	G	E					P	D	S			V		V	73%	96%
68			L	G	E					P	D	S			V		V	42%	70%
69			Q	G	E					P	D	S			V		V	60%	90%
70			R	G	E					P	D	S			V		V	55%	74%
71					E					P	D	S			V		V	19%	41%
72				R	E					P	D	S			V		V	25%	55%
73				S	E					P	D	S			V		V	29%	58%
63				G						P	D	S			V		V	24%	54%
74				G	L					P	D	S			V		V	26%	59%
75				G	P					P	D	S			V		V	36%	67%
76				G	R					P	D	S			V		V	19%	50%
77				G	S					P	D	S			V		V	19%	44%
64				G	E	H				P	D	S			V		V	60%	64%
65				G	E	K				P	D	S			V		V	90%	96%
66				G	E	S				P	D	S			V		V	87%	91%

45			G	E		R			P	D	S			V	V	39%	68%	
46			G	E		M			P	D	S			V	V	32%	59%	
47			G	E		H			P	D	S			V	V	31%	59%	
78			G	E			A		P	D	S			V	V	33%	63%	
79			G	E			F		P	D	S			V	V	39%	66%	
80			G	E			G		P	D	S			V	V	49%	74%	
38			G	E			V		P	D	S			V	V	78%	94%	
48			G	E				H	P	D	S			V	V	47%	74%	
49			G	E				I	P	D	S			V	V	58%	78%	
50			G	E				P	P	D	S			V	V	46%	80%	
51			G	E				L	P	D	S			V	V	27%	56%	
52			G	E				S	P	D	S			V	V	31%	57%	
53			G	E					P	D	S	V		V	V	50%	63%	
54			G	E					P	D	S		A	V	V	33%	55%	
55			G	E					P	D	S		E	V	V	46%	81%	
56			G	E					P	D	S		R	V	V	27%	59%	
57			G	E					P	D	S		T	V	V	33%	68%	
81			G	E					P	D	S				V	17%	51%	
82			G	E					P	D	S			E	V	37%	74%	
83			G	E					P	D	S			G	V	53%	87%	
84			G	E					P	D	S			L	V	17%	43%	
85			G	E					P	D	S			M	V	17%	25%	
86			G	E					P	D	S			Q	V	23%	45%	
33			G	E					P	D	S			R	V	40%	65%	
58			G	E					P	D	S			V	P	V	49%	59%
59			G	E					P	D	S			V	R	V	19%	46%
87			G	E					P	D	S			V	A	17%	53%	
88			G	E					P	D	S			V		20%	44%	
89			G	E					P	D	S			V	K	23%	43%	
90			G	E					P	D	S			V	M	16%	43%	
91			G	E					P	D	S			V	R	25%	52%	
19		R	G	E			H		P	D	S			V	V	67%	88%	
60		R	G	E			H		P	D	S			V	Q	V	64%	84%
61		R	G	E			H		P	D	S			V	P	V	61%	88%
62		R	G	E			H		P	D	S			V	R	V	52%	72%
92		R	G	E			H		P	D	S			V	A	61%	81%	
93		R	G	E			H		P	D	S			V		57%	75%	
94		R	G	E			H		P	D	S			V	K	20%	62%	
36		R	G	E			H		P	D	S			V	M	67%	85%	
95		R	G	E			H		P	D	S			V	R	40%	81%	

Для ясности, пустые клетки в соответствующем положении аминокислот в SEQ ID NO: 2 - NO: 108 определяют как идентичные аминокислотам, соответствующим SEQ ID NO: 1, выделяя только обмены в мутантном полипептиде ГФПД. Остаточная активность и остаточный оборот определяли в соответствии с примером 3 путем измерения k_{app} и общего изменения сигнала соответственно в присутствии и в отсутствии соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) (50 мкМ) при низкой концентрации субстрата. Для каждого мутантного полипептида ГФПД, k_{app} и общее изменение сигнала без гербицидов, ингибирующих ГФПД, служили для нормализации k_{app} и общего изменения сигнала в присутствии гербицида, и полученные %-значения суммируют.

Пример 5. Анализ на коричневый цвет для тестирования мутантных полипептидов ГФПД, устойчивых к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

Мутантные полипептиды ГФПД анализировали, используя анализ на коричневый цвет (WO 2014/043435). Бактериальные клетки, экспрессирующие мутантный полипептид ГФПД в соответствии с изобретением анализировали в 96-луночном формате на предмет устойчивости к ингибитору ГФПД путем точечного нанесения на твердую среду, содержащую LB-агар, агент отбора для вектора экспрессии pSE420(RI)NX (WO 2014/043435), 5 мМ тирозина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), 42 мМ сукцината (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) и шесть различных концентраций гербицида, ингибирующего ГФПД, соед. 1 (0 -500 мкМ).

В анализе на коричневый цвет, культуру клеток *E. Coli*, экспрессирующую в течение ночи один из соответствующих мутантных полипептидов ГФПД, разбавленную до OD600 в 1 и 10 мкл экстракта нанесли точно в трех повторностях на планшеты, содержащие 0, 25, 50, 100, 250 или 500 мкМ соед. 1.

Планшеты покрывали воздухопроницаемой лентой и инкубировали при 30 градусах С. Через 24 ч клетки выдерживали в темноте при комнатной температуре и через 7 дней визуально оценивали образование коричневого пигмента. В присутствии гербицида, ингибирующего ГФПД, это пигментное образование ингибируется и цвет планшета с агаром не будет изменяться, если экспрессируется и является активным полипептид ГФПД гербицида, ингибирующего устойчивую ГФПД. Рейтинг "+++" означает темно-коричневую окраску, как видно для клеток *E. coli*, экспрессирующих один из соответствующих мутантных полипептидов ГФПД без ингибитора в пластине агара LB. "+" и "0" оценивают среднюю и светло-коричневую пигментацию, соответственно, а "0" означает, что на планшетах с агаром LB не обнаружено развитие коричневой пигментации.

Таблица 6
Оценка устойчивости мутантных полипептидов ГФПД к соед. 1 (0-500 мкМ)
с использованием анализа на коричневый цвет

Концентрация Соед. 1 [мкМ]	Клетки <i>E. coli</i> , экспрессирующие полипептид ГФПД						
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	0	++	+++	+++	+++	++	+++
50	0	++	+++	+++	++	++	+++
100	0	++	+++	+++	++	++	+++
250	0	+	++	++	++	+	++
500	0	0	+	+	+	0	++

Примерные мутантные полипептиды ГФПД, представленные в табл. 6, проявляли улучшенную устойчивость к соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) по сравнению с полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO: 1 в настоящем изобретении. Уже при концентрации в 25 мкМ соед. 1, клетки *E. coli*, экспрессирующие полипептид ГФПД (соответствующий SEQ ID NO: 1) не производят коричневую пигментацию и некоторые мутантные полипептиды ГФПД проявляют пигментацию от темно- до умеренно коричневой.

Известный из уровня техники мутантный полипептид ГФПД (WO 2014/043435), соответствующий SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении развивал только незначительную коричневую пигментацию при 250 мкМ соед. 1. и терял свою коричневую пигментацию при 500 мкМ соед. 1, показывая полное ингибирование экспрессированных полипептидов ГФПД в клетке. Для сравнения, некоторые мутантные полипептиды ГФПД, изображенные в таблице 6 с SEQ ID NO: 31, 32, 96 и особенно с SEQ ID NO: 104 показывают более сильную коричневую окраску в присутствии 25, 50, 100, 250 и даже 500 мкМ соед. 1.

В дополнительном эксперименте мутантные полипептиды ГФПД анализировали с использованием принципа колориметрического анализа коричневого цвета (как, например, описано в US 6,768,044). Бактериальные клетки, экспрессирующие полипептиды ГФПД в соответствии с настоящим изобретением анализировали в планшете 96-луночного формата (планшет Nunc® 96 DeepWell™, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) для полипептидов ГФПД с улучшенной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ГФПД.

E. coli клетки выращивали в жидкой среде ЛБ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Карлсруэ, Германия), содержащей агент отбора для вектора экспрессии pSE420(RI)NX (WO 2014/043435) и 5 мМ парагидроксибензилпирувата (ГФП; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), в присутствии или в отсутствие гербицида, ингибирующего ГФПД, например, соед. 1 (1000 мкМ).

Ночную культуру культуры *E. coli*, экспрессирующую один из соответствующих полипептидов ГФПД в соответствии с настоящим изобретением доводили до OD₆₀₀ в 0.3 - 0.5 в конечном объеме 500 мкл и инкубировали при 30 градусах Цельсия. Остаточное образование коричневого цвета определяли путем измерения образования коричневого цвета (BCF) в присутствии и в отсутствие соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид).

Поэтому через 96 ч культуру центрифугировали и супернатант культуры использовали для измерения оптической плотности образования растворимого коричневого пигмента при 440 нм (OD_{440nm}).

Таблица 7

Оценка устойчивости примерных мутантных полипептидов ГФПД к соед. 1 (1000 мкМ) с использованием биоанализа на коричневый цвет и обнаружения остаточного образования коричневого цвета (BCF) через 96 ч

SEQ ID NO:	Положение аминокислот относительно полипептида ГФПД SEQ ID NO:1															Контроль- ный BCF OD _{410 нм}	Остаточ- ный BCF OD _{410 нм} [%]		
	204	213	264	268	270	310	315	330	331	335	336	337	338	339	340			344	345
1	A	R	M	P	T	Q	T	D	D	E	G	N	F	K	A	S	I	2.66	15%
2										P	W			A	Q			2.68	18%
7										P	D	S						1.83	40%
10										P	D	S			V		V	1.09	65%
14								H		P	D	S			V		V	1.42	63%
19			R	G	E			H		P	D	S			V		V	1.65	60%
21										P	H	S						0.99	65%
22										P	H	S			V			1.67	58%
24										P	H	S			V		V	1.56	48%
29				S	S					P	H	S			V		V	2.03	42%
30				S	S					P	H	S			V		K	1.70	56%
39	L			G	E					P	D	S			V		V	1.63	55%
40	M			G	E					P	D	S			V		V	1.89	58%
44		L		G	E					P	D	S			V		V	1.60	40%
46				G	E		M			P	D	S			V		V	2.47	66%
52				G	E			S		P	D	S			V		V	2.08	65%
56				G	E					P	D	S		R	V		V	1.98	68%
57				G	E					P	D	S		T	V		V	1.39	46%
59				G	E					P	D	S			V	R	V	1.29	51%
67			K	G	E					P	D	S			V		V	1.93	71%
72				R	E					P	D	S			V		V	2.77	72%
73				S	E					P	D	S			V		V	2.75	72%
76				G	R					P	D	S			V		V	2.73	58%
77				G	S					P	D	S			V		V	2.57	67%
81				G	E					P	D	S					V	2.05	39%
83				G	E					P	D	S			G		V	1.83	47%
86				G	E					P	D	S			Q		V	1.94	74%
87				G	E					P	D	S			V		A	1.91	68%
88				G	E					P	D	S			V			2.21	77%
89				G	E					P	D	S			V		K	2.36	67%
92			R	G	E			H		P	D	S			V		A	1.38	59%
97				G	R			H	S	P	D	S			V		K	1.54	49%
99				G	E					P	D	S	V		R		V	1.52	87%
100			L	G	E			H		P	D	S			V	Q	M	2.48	33%
102			L	R	E		R			P	H	S			V	Q	M	2.47	26%
106			L	G	E			H	P	P	D	S			V	Q	M	1.50	73%
107		K		G	E					P	H	S	V		R		V	1.38	84%

Примерные мутантные ГФПД полипептиды, приведенные в табл. 7, показали улучшенную устойчивость к соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) по сравнению с полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO: 1 и мутантным полипептидом ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435), соответствующим SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении. Оба полипептида ГФПД, соответствующие SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 не производили существенной коричневой пигментации в присутствии ингибитора ГФПД. Некоторые мутантные полипептиды ГФПД проявляли пигментацию от средней до темно-коричневой. Суммированные полученные "%-значения" в соответствующей Таблице 7 являются средствами по меньшей мере двух независимых экспериментов со

средним стандартным отклонением 5%.

Пример 6. Трансформация соевых бобов и устойчивость растений соевые бобы T0.

Трансформацию соевых бобов осуществляли с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как описанные с использованием опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* трансформации полусеменных эксплантатов соевых бобов, по существу применяя метод, описанный у Paz et al. (2006), Plant cell Rep. 25:206. Трансформанты идентифицировали, используя гербицид, ингибирующий ГФПД "темботрион" в качестве селекционного маркера. Наблюдали появление зеленых побегов и документировали как показатель устойчивости к гербициду, ингибирующему ГФПД - тебтотриону. Устойчивые трансгенные побеги показывали нормальный зеленый цвет, сопоставимый с побегами соевых бобов дикого типа, необработанных гербицидом, ингибирующим ГФПД - темботрионом, тогда как побеги соевых бобов дикого типа, обработанные таким же количеством гербицида, ингибирующего ГФПД - темботрионом, полностью отбеливались. Это указывало на то, что наличие соответствующего полипептида ГФПД задействовало устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, таким как темботрион.

Устойчивые зеленые побеги перенесли в субстрат для выращивания растений или прививали. Укоренившиеся растения были перенесены в теплицу после акклиматизационного периода. Затем растения, содержащие трансген, опрыскивали гербицидами, ингибирующими ГФПД, как например мезотрионом с нормой внесения 300 - 600 г АВ/га, или соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) с нормой внесения 150 г - 300 г АВ/га дополненным сульфатом аммония и метиловым эфиром рапсового масла. Через 5-10 дней после применения были оценены симптомы, связанные с применением гербицида, и их сравнивали с симптомами, наблюдаемыми на растениях дикого типа при тех же условиях.

Например, растения соевых бобов T0, имеющие "экспрессионную кассету растения", которая содержит полипептид ГФПД, устойчивый к ингибитору ГФПД в соответствии с настоящим изобретением, тестировали в отношении устойчивости к соед. 1.

До опытов в теплице с трансгенными растениями трансформанты соевых бобов регулярно анализировали на экспрессию и присутствие трансгенов с использованием метода обнаружения белка ELISA (см. подробное описание под пунктами D и H). Для анализа устойчивости к гербицидам использовали только растения, восстанавливающиеся в среде отбора и имеющие определяемую экспрессию трансгенного белка ГФПД. Опрыскиватель DeVries Tracker был откалиброван перед каждым опрыскиванием. Химический состав, используемый для соед. 1 добавляли сульфатом аммония и метилированным маслом из семян рапса. Испытания на опрыскивание проводили с концентрацией, которая равна 300 г АВ на гектар (300 г АВ/га). Устойчивость оценивали через 5 дней после опрыскивания. Растения соевых бобов дикого типа, опрысканные одним и тем же гербицидным составом, полностью отбеливались и проявляли более чем 95% повреждения листьев двух верхних листьев трилистника. Оценка "1" была присвоена растениям с незначительной переносимостью, т.е., верхние два листа трилистника показывают значительное отбеливание и незначительные признаки восстановления с повреждением листьев 50 - 95%. Оценку "2" присваивали растениям с умеренной устойчивостью, т.е., между 10-49% площади листа верхних двух листьев трилистника, что свидетельствует о значительной величине устойчивости к обработке гербицидами. Оценку "3" присваивали растениям с хорошей устойчивостью, т.е. менее чем 10% площади листьев из трех верхних листьев трилистника, демонстрирующих хлороз или только очень незначительное отбеливание. Результаты приведены в табл. 8.

Таблица 8

Оценка повреждения площади листьев трансгенных событий соевых бобов T0 через пять дней после применения соед. 1 с нормой 300 г АВ/га

События соевых бобов, экспрессирующие полипептид ГФПД	Оценки устойчивости к гербицидам				Общее количество обработанных событий	Процентное отношение событий с оценкой "2 & 3"
	0	1	2	3		
SEQ ID NO: 2	5	10	26	49	90	83.3%
SEQ ID NO: 32	1	0	10	28	39	97.4%
SEQ ID NO: 96	0	5	43	34	82	93.9%
SEQ ID NO: 31	4	1	21	30	56	91.1%

Результаты, приведенные в табл. 8 показывают, что значительная часть независимых событий соевых бобов T0 устойчивы к гербициду, ингибирующему ГФПД соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) с нормой 300 г АВ/га по сравнению с контрольными растениями соевых бобов дикого типа, также обработанными гербицидом, ингибирующим ГФПД - соед. 1.

Более чем 90% событий соевых бобов T0 с мутантными полипептидами ГФПД, соответствующими SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 96 и SEQ ID NO: 31 имеют менее чем 50% повреждения листьев и тем самым также лучше, чем полипептид ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435) популяции T0 с пропорцией в 83%, соответствующий SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении. К тому же ~72% событий соевых

бобов Т0 с мутантным полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO: 32, показывают менее чем 10% повреждения листьев, что снова показывает улучшение по сравнению с популяцией события соевых бобов Т0 (54%), со сверхэкспрессией полипептида ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435), соответствующего SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении.

В дополнительных опытах в теплице от 21 до 94 независимых событий соевых бобов Т0 на конструкцию, содержащую примерный мутантный полипептид ГФПД опрыскивали гербицидом, ингибирующим ГФПД соед.1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) с нормой 300 г АВ/га, дополненным сульфатом аммония и метиловым эфиром рапсового масла. Через пять дней после применения площадь поврежденных листьев, из-за действия гербицида, ингибирующего ГФПД, оценивают по шкале от 0 (без повреждений) до 100 (полное отбеливание). В этих условиях растения дикого типа были полностью отбелены, а их показатель повреждений находился в диапазоне 95 - 100.

В табл. 9 представлено распределение данных шкалы повреждений, вызванных гербицидом, ингибирующим ГФПД как процентиля для примерных мутантных полипептидов устойчивых к гербициду, ингибирующему ГФПД, (SEQ ID NOs). Процентили нормализуют категории показателя повреждений от отдельного растения в популяции. Значение 25-го процентиля представляет собой шкалу повреждений, где 25% событий соевых бобов в данной популяции имели более низкие и 75% более высокие показатели повреждений. Медиана представляет собой 50-й процентиля. Половина значений имела более высокие показатели повреждений; у половины были более низкие показатели повреждений. Значение 75-го и 90-го процентиля представляет собой показатель повреждения, где 75% и 90% событий соевых бобов имели соответственно более низкие показатели повреждений. Разница между 75-м и 25-м процентилем называется межквартильным диапазоном и маркером для количественного определения рассеяния в популяции. Все конструкции имели только одну кассетную вставку в геном соевых бобов.

В табл. 9, конструкции были ранжированы на основе показателей повреждений в соответствии с 75-м процентилем, от минимального до самого высокого показателя. Все примерные варианты полипептида ГФПД являются лучше во всех анализах процентиля, чем мутантный полипептид ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435), соответствующий SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении. Оценка мутантного полипептида ГФПД из уровня техники (WO 2014/043435), соответствующего SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении указана в нижнем ряду табл. 9.

Таблица 9

Оценка повреждения площади листьев трансгенных событий соевых бобов Т0 через пять дней после применения соед. 1 с нормой 300 г АВ/га по распределению процентиля

События соевых бобов Т0, экспрессирующие полипептид	Общее число независимых опрысканных событий	25-й	Медиана	75-й	Межквартильный диапазон	90-й
SEQ ID NO: 9	21	10.0	10.0	15.0	5.0	19.0
SEQ ID NO: 30	57	10.0	15.0	15.0	5.0	25.0
SEQ ID NO: 22	50	10.0	10.0	15.0	5.0	34.5
SEQ ID NO: 101	75	5.0	10.0	15.0	10.0	49.0
SEQ ID NO: 105	58	5.0	10.0	15.0	10.0	70.0
SEQ ID NO: 8	70	10.0	10.0	16.3	6.3	38.5
SEQ ID NO: 24	56	10.0	10.0	20.0	10.0	35.0
SEQ ID NO: 102	92	8.0	10.0	20.0	12.0	45.0
SEQ ID NO: 54	44	10.0	10.0	20.0	10.0	62.5
SEQ ID NO: 56	33	10.0	15.0	20.0	10.0	65.0
SEQ ID NO: 43	27	10.0	15.0	20.0	10.0	67.0
SEQ ID NO: 34	44	10.0	15.0	20.0	10.0	70.0
SEQ ID NO: 5	55	10.0	15.0	20.0	10.0	72.0
SEQ ID NO: 104	94	5.0	15.0	20.0	15.0	72.5
SEQ ID NO: 42	59	10.0	15.0	20.0	10.0	75.0
SEQ ID NO: 44	54	10.0	15.0	21.3	11.3	70.0
SEQ ID NO: 21	59	10.0	15.0	25.0	15.0	35.0
SEQ ID NO: 45	74	5.0	15.0	26.3	21.3	67.5
SEQ ID NO: 2	75	15.0	20.0	45.0	30.0	87.0

Пример 7. Создание и отбор растения хлопчатника Т0.

Трансформация хлопчатника достигается посредством использования способов, хорошо известных из уровня техники, особенно предпочтительный способ описан в РСТ патентной публикации WO 00/71733. Регенерированные растения переносят в теплицу. После периода акклиматизации, выросшие в достаточной мере растения, опрыскивают гербицидами, ингибирующими ГФПД, такими как, например, темботрион, эквивалентный 100 или 200 г АВ/га, с добавлением сульфата аммония и метилового эфира рапсового масла. Через семь дней после нанесения опрыскиванием, симптомы, связанные с обработкой гербицидом, ингибирующим ГФПД оценивают и сравнивают с симптомами, наблюдаемыми, на растениях хлопчатника дикого типа, которых подвергали одинаковой обработке при тех же условиях.

Пример 8. Трансформация растительных клеток маиса посредством трансформации, опосредован-

ной *Agrobacterium*.

Построение экспрессионной кассеты растения для пригодной экспрессии в растении маиса и трансформация маиса хорошо известны в уровне техники и в этом конкретном примере были описаны и использованы способы из заявок WO 2014/043435 и WO 2008/100353. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие мутантные ГФПД полипептиды, в данном изобретении накапливаются с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей вариант белка EPSPS для придания устойчивости к гербицидам, которые нацелены на EPSPS. Ген EPSPS выделяли и подвергали мутации из *Arthrobacter globiformis* (WO 2008/100353) и присоединяли внутри рамки к транзитной пептидной последовательности, чтобы направлять транслокацию транслированного белка в хлоропласт. Стабильную экспрессию осуществляют с помощью убиквитарного промотора (промотор Убиквитин 4 из сахарного тростника, Патент США 6,638,766), и 35S-терминирующую последовательность из мозаичного вируса цветной капусты, которая клонируется выше и ниже гена EPSPS, соответственно.

Соответствующий мутантный полипептид ГФПД будет клонирован с тем же промотором, транзитным пептидом хлоропласта, и терминирующей последовательностью, как описано для экспрессионной кассеты гена EPSPS. Кодирующие последовательности для обоих генов являются кодонами, оптимизированными для экспрессии маиса. Для трансформации маиса початки лучше всего собирают через 8-12 дней после опыления. Из початков выделяют эмбрионы, и именно эти эмбрионы размером 0,8-1,5 мм являются предпочтительными для использования при трансформации. Эмбрионы накладывают стороной скутеллума вверх на пригодную среду для инкубации, и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте.

Тем не менее, инкубировать эмбрионы именно в течение ночи, по сути, не является обязательным. Эмбрионы вводят в контакт со штаммом *Agrobacterium*, содержащим соответствующие векторы, имеющие нуклеотидную последовательность в соответствии с настоящим изобретением для опосредованного T1 плазмидой переноса в течение приблизительно 5-10 мин. и затем накладывают на среду для совместного культивирования в течение приблизительно 3 дней (при 25°C в темноте). После совместного культивирования эксплантаты переносят в среду периода восстановления приблизительно на пять дней (при 25°C в темноте). Эксплантаты инкубируют в селективной среде с глифосатом в течение до восьми недель, в зависимости от природы и характеристик конкретной использованной селективной среды. После периода селекции полученный каллус переносят в среду созревания эмбрионов, пока не наблюдалось образования зрелых соматических эмбрионов. Полученные зрелые соматические эмбрионы затем помещают под слабое освещение, и иницируют процесс регенерации, как известно из уровня техники. Полученным росткам дают укорениться в субстрате для выращивания, и полученные растения переносят в горшки для рассады и размножают как трансгенные растения. Растения регулярно анализировали на предмет экспрессии и присутствия трансгенов, используя метод обнаружения белков ELISA. Для анализа устойчивости к гербицидам использовали только растения, выделенные в селективной среде и обладающие выявляемой экспрессией трансгенного белка ГФПД.

Пример 9. Устойчивость растений T1 соевых бобов к гербицидам, ингибирующим ГФПД/полевые испытания.

Растения соевых бобов, экспрессирующих полипептид, устойчивый к гербициду, ингибирующему ГФПД, в соответствии с настоящим изобретением, одиночные, или наряду с геном, придающим устойчивость к глифосату и/или геном, придающим устойчивость к глюфосинату или имеющие "экспрессионную кассету растений", которые включают только полипептид, устойчивый к гербициду, ингибирующему ГФПД, в соответствии с настоящим изобретением, тестировали на предмет устойчивости к различным химическим классам гербицидов, ингибирующих. Трансгенные растения регулярно анализировали относительно экспрессии и присутствия трансгенов, используя метод обнаружения белков ELISA (см. подробное описание под пунктами D и H). Регенерировали только растения, восстановленные в селективной среде и имеющие экспрессию обнаружимого трансгенного белка ГФПД, их переносили в теплицу и на стадии роста V2-V4 использовали для анализа на устойчивость к гербицидам, ингибирующим ГФПД, событий соевых бобов T0 в теплице (пример 6). Химический состав с гербицидами, ингибирующими ГФПД, дополняли сульфатом аммония и метиловым эфиром рапсового масла. Оценку устойчивости к гербицидам проводили через 5-21 день после опрыскивания.

Самые эффективные независимые события соевых бобов T0 были самоопыляемыми для производства семян соевых бобов T1.

В полевых испытаниях усовершенствованные семена соевых бобов T1 высаживали и обрабатывали или посредством 210 г/га изоксафлутола или 150 г/га соед. 1 (2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид) на стадии роста V2-V4 (табл. 10) и повреждение листьев оценивали через восемь дней после нанесения гербицида, ингибирующего ГФПД. Все растения соевых бобов дикого типа или сегрегированные растения соевых бобов T1 без полипептида, устойчивого к ингибитору ГФПД опрыскивали тем же самым гербицидным составом и были полностью отбеленными и показывали 100% повреждение листьев через восемь дней после нанесения.

В табл. 10, представлена частота событий соевых бобов, проявляющих хорошую устойчивость, т.е. равное или менее чем 15% повреждение общей площади листьев.

Все примерные варианты полипептида, устойчивые к гербициду, ингибирующему ГФПД, приведенные в настоящем изобретении, имели более высокую частоту в популяции с хорошей устойчивостью с равным или менее чем 15% повреждением листьев и поэтому оказывались лучше, чем мутантный полипептид ГФПД из известного уровня техники (WO 2014/043435), соответствующий SEQ ID NO: 2 в настоящем изобретении.

Таблица 10. Оценка в полевых испытаниях повреждения площади листьев из примерных трансгенных событий соевых бобов T1 на стадии роста V2-V4, экспрессирующих различные варианты полипептида ГФПД, обработанных или посредством 210 г/га изоксафлутола (табл. 10a) или 150 г/га соед. 1 (табл. 10b).

Таблица 10a

Полевые испытания примерных трансгенных событий соевых бобов, опрысканных посредством 210 г/г изоксафлутола и оцененные через восемь дней после нанесения

События соевых бобов T1, экспрессирующие полипептид ГФПД	Общее количество независимых опрысканных событий	Независимые события с $\leq 15\%$ повреждением листьев после опрыскивания	Частота в популяции
SEQ ID NO:2	39	10	26%
SEQ ID NO: 16	20	19	95%
SEQ ID NO: 18	20	12	60%
SEQ ID NO: 31	14	13	93%
SEQ ID NO: 32	24	12	50%
SEQ ID NO: 96	20	11	55%

Таблица 10b

Полевые испытания примерных трансгенных событий соевых бобов T1, опрысканных посредством 150 г/га соед. 1 и оцененные через восемь дней после нанесения

События соевых бобов T1, экспрессирующие полипептид ГФПД	Общее количество независимых опрысканных событий	Независимые события с $\leq 15\%$ повреждением листьев после опрыскивания	Частота в популяции
SEQ ID NO:2	39	16	41%
SEQ ID NO: 16	20	19	95%
SEQ ID NO: 18	20	12	60%
SEQ ID NO: 31	14	12	86%
SEQ ID NO: 32	24	10	42%
SEQ ID NO: 96	20	14	70%

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в описании, указывают на уровень навыков специалистов в области техники, к которой относится это изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в настоящее описание путем ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно обозначена как включенная путем ссылки.

Хотя изложенное изобретение описано в некоторых подробностях путем иллюстрации и примеров с целью ясности понимания, будет очевидно, что в объеме прилагаемой формулы изобретения могут быть осуществлены определенные изменения и модификации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (ГФПД), состоящий из аминокислотной последовательности, включающей: (а) пролин в положении, соответствующем положению 335 в SEQ ID NO: 1, (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 336 в SEQ ID NO: 1, и (в) серин в положении, соответствующем положению 337 в SEQ ID NO: 1, причем указанный полипептид ГФПД является устойчивым по меньшей мере к одному гербициду, ингибирующему ГФПД.

2. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, дополнительно содержащей:

- i) метионин, треонин, серин или лейцин в положении, соответствующем положению 204 в SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) лизин или лейцин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или
- iii) аргинин, лизин, глутамин или лейцин в положении, соответствующем положению 264 в SEQ ID NO: 1; и/или
- iv) аргинин, глицин или серин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1;

и/или

v) аргинин, лейцин, глутаминовую кислоту, пролин или серин в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или

vi) серин, гистидин или лизин в положении, соответствующем положению 310 в SEQ ID NO: 1; и/или vii. аргинин, метионин или гистидин в положении, соответствующем положению 315 в SEQ ID NO: 1; и/или

viii) гистидин, аланин, фенилаланин, валин или глицин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или

ix) пролин, гистидин, серин, изолейцин или лейцин в положении, соответствующем положению 331 в SEQ ID NO: 1; и/или

x) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или

xi) глутаминовую кислоту, аргинин, аланин или треонин в положении, соответствующем положению 339 в SEQ ID NO: 1; и/или

xii) аргинин, глутамин, метионин, глутаминовую кислоту, глицин, лейцин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или

xiii) глутамин, пролин или аргинин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или

xiv) лизин, аргинин, метионин, аланин или валин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

3. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, дополнительно содержащей:

i) лейцин или лизин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или

ii) аргинин или лейцин в положении, соответствующем положению 264 в SEQ ID NO: 1; и/или

iii) аргинин, глицин или серин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1;

и/или

iv) глутаминовую кислоту или серин в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин или метионин в положении, соответствующем положению 315 в SEQ ID NO: 1; и/или

vi) гистидин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или

vii) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или

viii) аргинин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или

ix) глутамин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или

x) лизин, валин или метионин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

4. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид ГФПД состоит из аминокислотной последовательности, дополнительно содержащей:

i) лизин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или

ii) аргинин или лейцин в положении, соответствующем положению 264 в SEQ ID NO: 1; и/или

iii) глицин или аргинин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1; и/или

iv) глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин в положении, соответствующем положению 315 в SEQ ID NO: 1; и/или

vi) гистидин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или

vii) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или

viii) аргинин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или

ix) глутамин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или

x) лизин, валин или метионин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

5. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что указанный полипептид ГФПД содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности представленной в SEQ ID NO: 1.

6. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что представляет собой синтетический полинуклеотид для экспрессии в растении.

7. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что она функционально связана с промотором, способным управлять ее экспрессией в клетке растения.

8. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанный гербицид представляет собой трикетон, дикетонитрил, изоксазол, гидроксипиразол, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамид, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамид, N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамид, производное пиридазинона, производное оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамид, триазинон или пиазолон.

9. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.8, отличающаяся тем, что указанный гербицид представляет собой бензобциклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион, изоксафлутол, дикетонитрил, пиразоксифен, бензофенап, пиазолинат, пиазульфотол, топразамезон, толпиралат, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид, 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид,

4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид или 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид.

10. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

11. Клетка-хозяин по п.10, представляющая собой бактериальную клетку-хозяина.

12. Клетка-хозяин по п.10, представляющая собой клетку растения.

13. Трансгенное растение, содержащее рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

14. Растение по п.13, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой маис, сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветное растение, перец, картофель, хлопчатник, рис, соевый боб, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень или масличный рапс.

15. Трансгенное растение по п.13, содержащее рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

16. Рекомбинантный полипептид ГФПД, состоящий из аминокислотной последовательности, включающей (а) пролин в положении, соответствующем положению 335 в SEQ ID NO: 1, (б) гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 336 в SEQ ID NO: 1, и (в) серин в положении, соответствующем положению 337 в SEQ ID NO: 1, причем указанный полипептид ГФПД является устойчивым по меньшей мере к одному гербициду, ингибирующему ГФПД.

17. Рекомбинантный полипептид по п.16, отличающийся тем, что он состоит из аминокислотной последовательности, которая дополнительно содержит:

i) метионин, треонин, серин или лейцин в положении, соответствующем положению 204 в SEQ ID NO: 1; и/или

ii) лизин или лейцин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или

iii) аргинин, лизин, глутамин или лейцин в положении, соответствующем положению 264 в SEQ ID NO: 1; и/или

iv) аргинин, глицин или серин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин, лейцин, глутаминовую кислоту, пролин или серин в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или

vi) серин, гистидин или лизин в положении, соответствующем положению 310 в SEQ ID NO: 1; и/или

vii) аргинин, метионин или гистидин в положении, соответствующем положению 315 в SEQ ID NO: 1; и/или

viii) гистидин, аланин, фенилаланин, валин или глицин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или

ix) пролин, гистидин, серин, изолейцин или лейцин в положении, соответствующем положению 331 в SEQ ID NO: 1; и/или

x) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или

xi) глутаминовую кислоту, аргинин, аланин или треонин в положении, соответствующем положению 339 в SEQ ID NO: 1; и/или

xii) аргинин, глутамин, метионин, глутаминовую кислоту, глицин, лейцин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или

xiii) глутамин, пролин или аргинин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или

xiv) лизин, аргинин, метионин, аланин или валин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

18. Рекомбинантный полипептид по п.16, отличающийся тем, что он состоит из аминокислотной последовательности, которая дополнительно содержит:

i) лейцин или лизин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или

ii) аргинин или лейцин в положении, соответствующем положению 264 в SEQ ID NO: 1; и/или

iii) аргинин, глицин или серин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1; и/или

iv) глутаминовую кислоту или серин в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или

v) аргинин или метионин в положении, соответствующем положению 315 в SEQ ID NO: 1; и/или

vi) гистидин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или

vii) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или

viii) аргинин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или

ix) глутамин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или

x) лизин, валин или метионин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

19. Рекомбинантный полипептид по п.16, отличающийся тем, что он состоит из аминокислотной

последовательности, которая дополнительно содержит:

- i) лизин в положении, соответствующем положению 213 в SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) аргинин или лейцин в положении, соответствующем положению в 264 SEQ ID NO: 1; и/или
- iii) глицин или аргинин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1; и/или
- iv) глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1; и/или
- v) аргинин в положении, соответствующем положению в 315 SEQ ID NO: 1; и/или
- vi) гистидин в положении, соответствующем положению 330 в SEQ ID NO: 1; и/или
- vii) валин в положении, соответствующем положению 338 в SEQ ID NO: 1; и/или
- viii) аргинин или валин в положении, соответствующем положению 340 в SEQ ID NO: 1; и/или
- ix) глутамин в положении, соответствующем положению 344 в SEQ ID NO: 1; и/или
- x) лизин, валин или метионин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1.

20. Рекомбинантный полипептид ГФПД, состоящий из аминокислотной последовательности, включающей глицин или аргинин в положении, соответствующем положению 268 в SEQ ID NO: 1, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 270 в SEQ ID NO: 1, пролин в положении, соответствующем положению 335 в SEQ ID NO: 1, гистидин или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 336 в SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 337 в SEQ ID NO: 1, валин в положении, соответствующем 340 в SEQ ID NO: 1; и валин в положении, соответствующем положению 345 в SEQ ID NO: 1, причем указанный полипептид ГФПД является устойчивым по меньшей мере к одному гербициду, ингибирующему ГФПД.

21. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.16-20, отличающийся тем, что указанный полипептид ГФПД содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

22. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.16-20, отличающийся тем, что указанный гербицид представляет собой трикетон, дикетонитрил, изоксазол, гидроксипиразол, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамид, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамид, N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамид, производное пиридазинона, производное оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамид, триазинон или пиразолон.

23. Рекомбинантный полипептид по п.22, отличающийся тем, что указанный гербицид представляет собой бензобициклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион, изоксафлутол, дикетонитрил пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид, 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид или 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид.

24. Способ получения полипептида ГФПД, устойчивого к гербицидам, ингибирующим ГФПД, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 в условиях, в которых экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.16-20.

25. Трансгенное растение, имеющее устойчиво встроенный в его геном конструкцию ДНК, содержащую промотор, функционально связанный с рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5.

26. Растение по п.25, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой маис, сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветное растение, перец, картофель, хлопчатник, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень или масличный рапс.

27. Способ борьбы с сорными травами в поле, включающий в себя посадку растения по п.25 или семени по п.15 в поле и обработку указанного поля эффективной концентрацией гербицида, ингибирующего ГФПД.

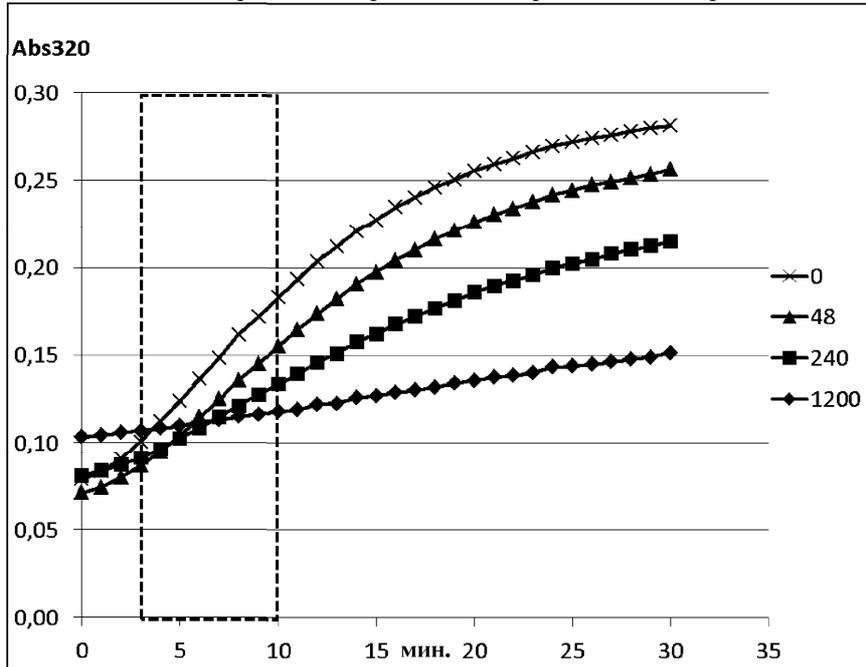
28. Способ по п.27, отличающийся тем, что гербицид представляет собой трикетон, дикетонитрил, изоксазол, гидроксипиразол, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамид, N-(1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензамид, N-(тетразол-5-ил)- или N-(триазол-5-ил)арилкарбоксамид, производное пиридазинона, производное оксопразина, N-(триазол-2-ил)арилкарбоксамид, триазинон или пиразолон.

29. Способ по п.27, отличающийся тем, гербицид представляет собой бензобициклон, сулькотрион, мезотрион, темботрион, тефурилтрион, бициклопирон, фенквинотрион, изоксафлутол, дикетонитрил пиразоксифен, бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, топрамезон, толпиралат, 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид, 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 4-(дифторметил)-2-метокси-3-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид или 2-(метоксиметил)-3-(метилсульфинил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид.

30. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4 для придания растению устойчивости по меньшей мере к одному гербициду, ингибирующему ГФПД.

31. Товарный продукт, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4 или ре-

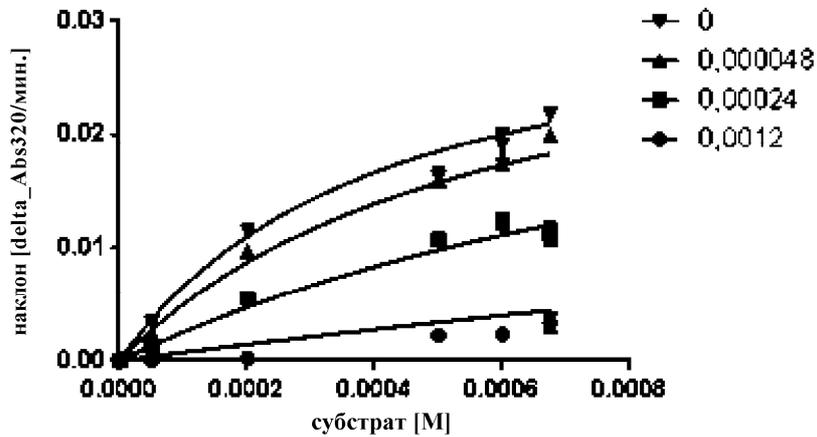
Кинетические изменения поглощения при 320 нм (Abs320) очищенного мутантного полипептида ГФПД, соответствующего SEQ ID NO: 17, наблюдаемого с 200 мкМ НРР и 0, 48, 240 или 1200 мкМ соед. 2 в связанном анализе активности ГФПД. Видимую кинетическую константу (k_{app}) определяли как изменение сигнала во времени с ограниченным временным интервалом



Фиг. 3

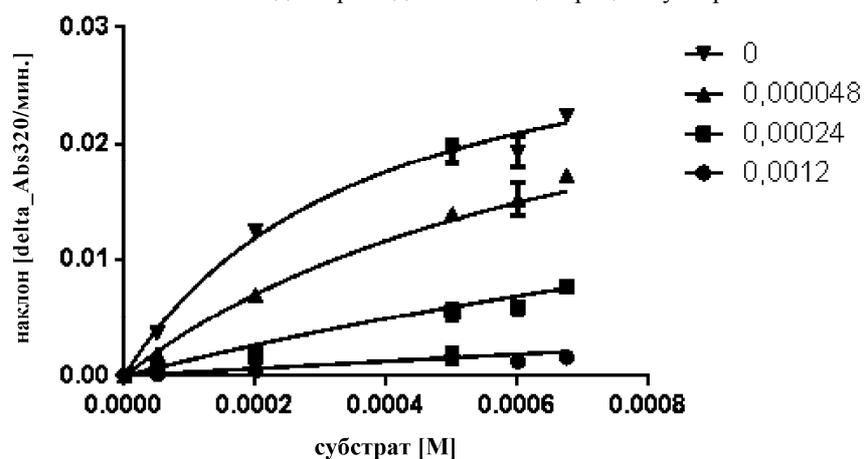
Примерное определение k_i с очищенным мутантным полипептидом ГФПД, соответствующим SEQ ID NO:17 с различными концентрациями ингибитора и субстрата (ГФП) путем подгонки в соответствии с моделью конкурентного ингибирования.

Кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{Abs320}/\text{мин}$) в присутствии 0-0.0012 М соед. 2 при заданной концентрации субстрата



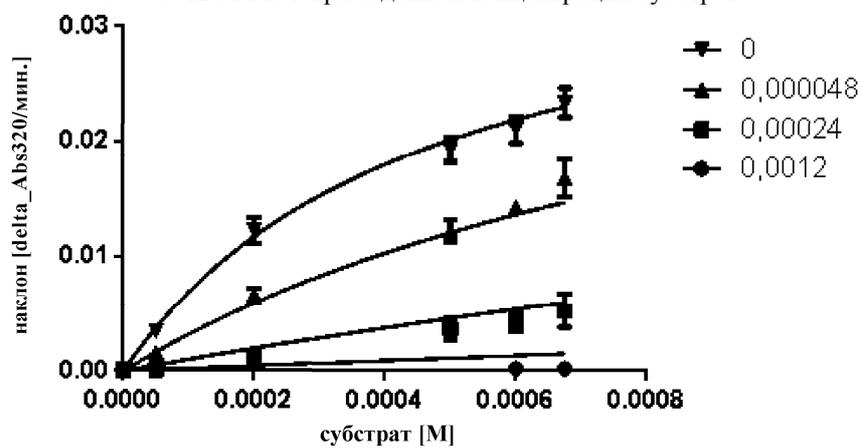
Фиг. 4а

Кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{\text{Abs320}}/\text{мин}$) в присутствии 0-0.0012 М соедин. 1 при заданной концентрации субстрата



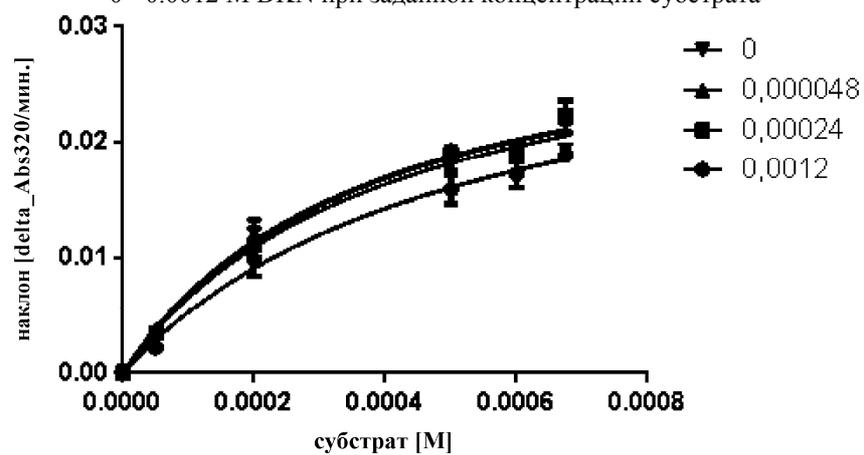
Фиг. 4б

Кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{\text{Abs320}}/\text{мин}$) в присутствии 0 - 0.0012 М MST при заданной концентрации субстрата



Фиг. 4в

Кинетические изменения поглощения при 320 нм с течением времени ($\Delta_{\text{Abs}320}/\text{мин}$) в присутствии 0 - 0.0012 М DKN при заданной концентрации субстрата



Фиг. 4г

