

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992824** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.06

(22) Дата подачи заявки
2018.04.18

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/32 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)

**(54) ИНСЕКТИЦИДНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ УЛУЧШЕННЫМ
СПЕКТРОМ АКТИВНОСТИ, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/511,385

(32) 2017.05.26

(33) US

(86) PCT/US2018/028105

(87) WO 2018/217333 2018.11.29

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

(72) Изобретатель:
**Лю Альберт Л., Нельсон Марк
Эдвард, У Гусуй, Ямамото Такаси (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены нуклеиновые кислоты и их варианты и фрагменты, полученные из штаммов *Bacillus thuringiensis*, кодирующие вариантные полипептиды, обладающие повышенной пестицидной активностью против насекомых-вредителей, в том числе *Lepidoptera* и *Coleoptera*. Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие пестицидные белки, пестицидные композиции, ДНК-конструкции и трансформированные микроорганизмы и растения, содержащие нуклеиновую кислоту согласно вариантам осуществления. Данные композиции находят применение в способах контроля вредителей, в особенности вредителей растений.

201992824

A1

A1

201992824

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560380EA/061

ИНСЕКТИЦИДНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ УЛУЧШЕННЫМ СПЕКТРОМ АКТИВНОСТИ, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

Перечень последовательностей с названием файла "7443PSP_SequenceListing.txt", созданный 19 мая 2017 года и имеющий размер 801 килобайта, подается в машиночитаемой форме одновременно с настоящим описанием. Перечень последовательностей является частью настоящего описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным нуклеиновым кислотам, которые кодируют пестицидные полипептиды, обладающие инсектицидной активностью против кукурузной совки и/или травяной совки и/или улучшенным спектром пестицидной активности против насекомых-вредителей. В композициях и способах согласно настоящему изобретению используют раскрытые нуклеиновые кислоты и кодируемые ими пестицидные полипептиды для контроля вредителей растений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Насекомые-вредители представляют собой основной фактор, причиняющий ущерб сельскохозяйственным культурам в мире. Например, поедание совками, повреждение совкой-ипсилон или повреждение кукурузным мотыльком могут приводить к разрушительным экономическим последствиям для сельскохозяйственных производителей. Связанный с насекомым-вредителем ущерб от нападений кукурузного мотылька только на полевую и сладкую кукурузу достиг приблизительно одного миллиарда долларов в год по издержкам от повреждения и затратам на контроль.

Традиционно, главным способом для оказания воздействия на популяции насекомых-вредителей является применение химических инсектицидов широкого спектра действия. Тем не менее, потребители, также как и государственные регулирующие органы становятся все более обеспокоенными риском неблагоприятного воздействия на окружающую среду, связанного с получением и применением синтетических химических пестицидов. Вследствие таких опасений регулирующие органы запретили или ограничили применение некоторых из более опасных пестицидов. Таким образом, разработка альтернативных пестицидов представляет существенный интерес.

Биологический контроль насекомых-вредителей, имеющих сельскохозяйственное значение, с применением средства микробного происхождения, такого как грибы, бактерии или другие виды насекомых, представляет собой не оказывающую негативного влияния на окружающую среду и коммерчески привлекательную альтернативу синтетическим химическим пестицидам. В целом можно сказать, что применение биопестицидов создает меньший риск загрязнения и неблагоприятных воздействий на

окружающую среду, и биопестициды обеспечивают специфичность в отношении большего числа мишеней, чем та, которая характерна для традиционных химических инсектицидов широкого спектра действия. Кроме того, зачастую получение биопестицидов стоит дешевле и, вследствие этого, улучшается экономически эффективный выход продукции для широкого ряда сельскохозяйственных культур.

Определенные виды микроорганизмов из рода *Bacillus*, как известно, обладают пестицидной активностью против широкого спектра насекомых-вредителей, в том числе *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* и других. *Bacillus thuringiensis* (Bt) и *Bacillus papilliae* входят в число наиболее успешных средств биологического контроля, обнаруженных на сегодняшний день. Патогенность в отношении насекомых также приписывалась штаммам *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* (Harwood, ed., ((1989) *Bacillus* (Plenum Press), 306) и *B. cereus* (WO 96/10083). Пестицидная активность, как оказывается, сконцентрирована в параспоральных кристаллических белковых включениях, хотя пестицидные белки также были выделены из *Bacillus* на вегетативной стадии роста. Несколько генов, кодирующих данные пестицидные белки, были выделены и охарактеризованы (см., например, патенты США №№ 5366892 и 5840868).

Микробные инсектициды, в частности полученные из штаммов *Bacillus*, сыграли важную роль в сельском хозяйстве в качестве альтернативы химическому контролю вредителей. Недавно ученые в области сельского хозяйства разработали культурные растения с улучшенной устойчивостью к насекомым с помощью генной инженерии культурных растений для получения пестицидных белков *Bacillus*. Например, с помощью генной инженерии были разработаны растения кукурузы и хлопчатника для получения пестицидных белков, выделенных из штаммов Bt (см., например, Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59(3):417-425; Schnepf et al. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3):775-806). Данные сельскохозяйственные культуры, разработанные с помощью генной инженерии, в настоящее время широко применяются в американском сельском хозяйстве и предоставляют фермеру не оказывающую негативного влияния на окружающую среду альтернативу традиционным способам контроля насекомых. Кроме того, разновидности картофеля, измененные с помощью генной инженерии таким образом, чтобы они содержали пестицидные токсины Cgt, реализовывались американским фермерам. Несмотря на то, что они были признаны очень успешными с коммерческой точки зрения, у данных разработанных с помощью генной инженерии устойчивых к насекомым культурных растений обеспечивается устойчивость только к узкому спектру экономически важных насекомых-вредителей.

Соответственно, остается потребность в новых токсинах Bt с улучшенным спектром инсектицидной активности против насекомых-вредителей, например, в токсинах с улучшенной активностью против насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*. Кроме того, остается потребность в биопестицидах, обладающих активностью против ряда насекомых-вредителей, и в биопестицидах, которые обладают улучшенной инсектицидной активностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предусматриваются композиции и способы для оказания воздействия на насекомых-вредителей. Более конкретно, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам оказания воздействия на насекомых с использованием нуклеотидных последовательностей, кодирующих инсектицидные пептиды, получения трансформированных микроорганизмов и растений, которые экспрессируют инсектицидный полипептид согласно вариантам осуществления. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды, которые являются пестицидными в отношении по меньшей мере одного насекомого, принадлежащего к отряду *Lepidoptera*.

В некоторых аспектах предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты и их фрагменты и варианты, которые кодируют полипептиды, обладающие пестицидной активностью против насекомых-вредителей (например, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, и SEQ ID NO: 46, и которые кодируют полипептид с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45, соответственно). В вариантах осуществления дополнительно предусмотрены фрагменты и варианты раскрытой нуклеотидной последовательности, которые кодируют биологически активные (например, инсектицидные) полипептиды.

В другом аспекте предусмотрены вариантные полипептиды Cry1B, кодируемые модифицированной (например, подвергнутой мутагенезу или манипуляции) молекулой нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления. В конкретных примерах пестицидные белки согласно вариантам осуществления включают фрагменты полноразмерных белков и полипептидов, которые получены из подвергнутых мутагенезу нуклеиновых кислот, сконструированных для введения конкретных аминокислотных последовательностей в полипептиды согласно вариантам осуществления. В конкретных вариантах осуществления полипептиды обладают усиленной пестицидной активностью по сравнению с активностью встречающегося в природе полипептида, из которого они получены.

В другом аспекте предусмотрены химерные полипептиды Cry1B.

В другом аспекте нуклеиновые кислоты согласно вариантам осуществления также можно применять для получения трансгенных (например, трансформированных) однодольных или двудольных растений, которые характеризуются геномами, которые содержат по меньшей мере одну стабильно встроенную нуклеотидную конструкцию, содержащую кодирующую последовательность согласно вариантам осуществления,

функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией кодируемого пестицидного полипептида. Соответственно, также предусмотрены трансформированные клетки растений, ткани растений, растения и их семена.

В другом аспекте трансформированные растения можно получить с применением нуклеиновой кислоты, которая была оптимизирована для повышенной экспрессии в растении-хозяине. Например, один из пестицидных полипептидов согласно вариантам осуществления можно подвергнуть обратной трансляции с получением нуклеиновой кислоты, содержащей кодоны, оптимизированные для экспрессии в конкретном хозяине, например, в культурном растении, таком как растение кукурузы (*Zea mays*). Экспрессия кодирующей последовательности в таком трансформированном растении (например, двудольном или однодольном) будет приводить к получению пестицидного полипептида и придавать растению повышенную устойчивость к насекомым. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены трансгенные растения, экспрессирующие пестицидные полипептиды, которые находят применение в способах оказания воздействия на различных насекомых-вредителей.

В другом аспекте предусмотрены пестицидные или инсектицидные композиции, содержащие варианты полипептиды Cry1B согласно вариантам осуществления, при этом композиция может необязательно содержать дополнительные инсектицидные пептиды. Варианты осуществления охватывают применение таких композиций в отношении среды обитания насекомых-вредителей с целью оказания воздействия на насекомых-вредителей.

Композиции и способы для пакетирования одного полинуклеотида, кодирующего вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, рассматриваются в раскрытии. В одном варианте осуществления композиции и способы для пакетирования полинуклеотида, кодирующего один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и второй вариантный полипептид Cry1B характеризуются отличающимися механизмами действия или отличающимся участком приложения действия. В другом варианте осуществления композиции и способы для пакетирования полинуклеотида одного вариантного полипептида Cry1B вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим второй вариантный полипептид Cry1B, где второй вариантный полипептид Cry1B характеризуется активностью в отношении насекомого, устойчивого к активности первого вариантного полипептида Cry1B, также рассматриваются в раскрытии. В другом варианте осуществления каждый из первого варианта Cry1B и отличающегося второго варианта Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43

(SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29). В другом варианте осуществления первый вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), и при этом второй вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29). В другом варианте осуществления первый вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), и IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), и при этом второй вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), и SL8-02 (SEQ ID NO: 144).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1A-1G показано выравнивание аминокислотных последовательностей с применением модуля ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), IP1B-B1 (SEQ ID NO: 3), IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), MP258 (SEQ ID

NO: 47), и GS060 (SEQ ID NO: 49). Выделено отличие аминокислотных последовательностей между полипептидами Cry1B.

На фигурах 2A-2E показана аминокислотная последовательность MP258 с лидерным участком (*), доменом I (#), доменом II (&) и доменом III (!), обозначенными под последовательностью.

На фигуре 3 показано выравнивание аминокислотных последовательностей домена I Cry1Be-типа из Cry1Be (аминокислоты 35-276 в SEQ ID NO: 58) и домена I Cry1Be-типа из MP258 (аминокислоты 36-276 в SEQ ID NO: 47) с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI®. Выделено отличие между аминокислотными последовательностями в доменах I полипептидов Cry1B.

На фигуре 4 показано выравнивание аминокислотных последовательностей с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI® домена III из Cry1Ah (SEQ ID NO: 61), Cry1Bd, Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54), и MP258 (SEQ ID NO: 47). Выделено отличие между аминокислотными последовательностями в домене III полипептидов Cry1B.

На фигуре 5A-5C показано выравнивание аминокислотных последовательностей с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI® домена I и домена II из MP258 (SEQ ID NO: 47), Cry1Be (SEQ ID NO: 58), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54), Cry1Bg (SEQ ID NO: 60), Cry1Bf (SEQ ID NO: 59), Cry1Ba (SEQ ID NO: 55), Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), Cry1Bb (SEQ ID NO: 56), и Cry1Bc (SEQ ID NO: 57). Выделено отличие аминокислотных последовательностей между доменом I и доменом II полипептидов Cry1B.

На фигуре 6A-6G показано выравнивание аминокислотных последовательностей с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI® вариантных полипептидов Cry1B IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78). Выделено отличие аминокислотных последовательностей между полипептидами Cry1B.

На фигурах 7A-7B показано выравнивание аминокислотных последовательностей Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), MP258 (SEQ ID NO: 47) и химерных форм на основе Cry1Bd/MP258, MO2-01 (SEQ ID NO: 145) и MO2-02 (SEQ ID NO: 146), с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI®.

На фигуре 8 показано выравнивание аминокислотных последовательностей от 101 по 250 аминокислоту Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) и химерных полипептидов на основе альфа-спиралей домена I Cry1Bd/MP258 MO5-01 (SEQ ID NO: 148), MO5-02 (SEQ ID NO: 155), MO5-03 (SEQ ID NO: 156), MO5-04 (SEQ ID NO: 157), MO5-05 (SEQ ID NO: 158), MO5-06 (SEQ ID NO: 159), и MO5-07 (SEQ ID NO: 160), с применением модуля ALIGNX® из

пакета программ Vector NTI®. Выделены отличия между аминокислотами в Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) и химерных формах на основе альфа-спиралей домена I Cry1Bd/MP258.

На фигуре 9 показано выравнивание аминокислотных последовательностей от 101 по 250 аминокислоту MP258 (SEQ ID NO: 47) и химерных полипептидов на основе альфа-спиралей домена I Cry1Bd/MP258 MO4-01 (SEQ ID NO: 147), MO4-02 (SEQ ID NO: 148), MO4-03 (SEQ ID NO: 149), MO4-04 (SEQ ID NO: 150), MO4-05 (SEQ ID NO: 151), MO4-06 (SEQ ID NO: 152), и MO4-07 (SEQ ID NO: 153), с применением модуля ALIGNX® из пакета программ Vector NTI®. Выделены отличия между аминокислотами в MP258 (SEQ ID NO: 1) и химерных формах на основе альфа-спиралей домена I Cry1Bd/MP258.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на композиции и способы для оказания воздействия на насекомых-вредителей, в частности вредителей растений. Более конкретно, выделенная нуклеиновая кислота согласно вариантам осуществления и ее фрагменты и варианты содержат нуклеотидные последовательности, которые кодируют пестицидные полипептиды (например, белки). Раскрытые пестицидные белки являются биологически активными (например, пестицидными) против насекомых-вредителей, таких как без ограничения насекомые-вредители из отряда Lepidoptera и/или Coleoptera.

Композиции согласно вариантам осуществления содержат выделенные нуклеиновые кислоты и их фрагменты и варианты, которые кодируют пестицидные полипептиды, кассеты экспрессии, содержащие нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления, выделенные пестицидные белки и пестицидные композиции. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные пестицидные полипептиды, обладающие улучшенной инсектицидной активностью против чешуекрылых по сравнению с пестицидной активностью соответствующего белка дикого типа. В вариантах осуществления дополнительно предусмотрены растения и микроорганизмы, трансформированные посредством данных новых нуклеиновых кислот, и способы, предполагающие применение таких нуклеиновых кислот, пестицидных композиций, трансформированных организмов и продуктов из них при оказании воздействия на насекомых-вредителей.

Нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно применять для трансформации любого организма для обеспечения выработки кодируемых пестицидных белков. Предусмотрены способы, которые предполагают применение таких трансформированных организмов для оказания воздействия на вредителей растений или для их контроля. Нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно также применять для трансформации органелл, таких как хлоропласты (McBride et al. (1995) *Biotechnology* 13: 362-365; и Kota et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1840-1845).

Варианты осуществления дополнительно относятся к идентификации фрагментов и вариантов встречающейся в природе кодирующей последовательности, которые кодируют

биологически активные пестицидные белки. Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления находят непосредственное применение в способах оказания воздействия на вредителей, в частности насекомых-вредителей, таких как вредители из отряда *Lepidoptera*. Соответственно, в вариантах осуществления предусмотрены новые подходы к оказанию воздействия на насекомых-вредителей, которые не зависят от применения традиционных синтетических химических инсектицидов. Варианты осуществления предполагают выявление встречающихся в природе биоразлагаемых пестицидов и генов, которые их кодируют.

В вариантах осуществления дополнительно предусмотрены фрагменты и варианты встречающейся в природе кодирующей последовательности, которые также кодируют биологически активные (например, пестицидные) полипептиды. Нуклеиновые кислоты согласно вариантам осуществления охватывают последовательности нуклеиновой кислоты или нуклеотидные последовательности, которые были оптимизированы для экспрессии в клетках конкретного организма, например, последовательности нуклеиновой кислоты, которые были подвергнуты обратной трансляции (т. е. трансляции в обратном направлении) с применением предпочтительных для растения кодонов на основе аминокислотной последовательности полипептида, обладающего усиленной пестицидной активностью. В вариантах осуществления дополнительно предусмотрены мутации, которые придают улучшенные или измененные свойства полипептидам согласно вариантам осуществления. См., например, патент США № 7462760.

В последующем описании широко применяют ряд выражений. Следующие определения предусмотрены для облегчения понимания вариантов осуществления.

Единицы измерения, приставки и обозначения могут обозначаться в форме, принятой в системе СИ. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записаны слева направо в направлении от 5' к 3'; аминокислотные последовательности соответственно записаны слева направо в направлении от аминогруппы к карбоксигруппе. Диапазоны числовых значений включают числа, определяющие диапазон. Аминокислоты могут обозначаться в данном документе либо с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды аналогично могут быть обозначены с помощью их общепринятых однобуквенных кодов. Вышеупомянутые термины более полно определены со ссылкой на настоящее описание в целом.

Как используется в данном документе, "нуклеиновая кислота" включает ссылку на полимер из дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов в одно- либо в двухнитевой форме, и если не ограничено иным образом, охватывает известные аналоги (например, пептидные нуклеиновые кислоты), характеризующиеся необходимыми качествами природных нуклеотидов, заключающимися в том, что они гибридизируются с одонитевыми нуклеиновыми кислотами подобно встречающимся в природе нуклеотидам.

Как используется в данном документе, термины "кодирующий" или "кодируемый",

когда они используются в контексте определенной нуклеиновой кислоты, означают, что нуклеиновая кислота содержит необходимую информацию для управления трансляцией нуклеотидной последовательности в определенный белок. Информация, по которой кодируется белок, определяется с помощью кодонов. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок, может содержать нетранслируемые последовательности (например, интроны) в пределах транслируемых участков нуклеиновой кислоты или может не содержать такие промежуточные нетранслируемые последовательности (например, как в кДНК).

Как используется в данном документе, выражение "полноразмерная последовательность" в отношении определенного полинуклеотида или кодируемого им белка означает наличие полной последовательности нуклеиновой кислоты или полной аминокислотной последовательности нативной (несинтетической) эндогенной последовательности. Полноразмерный полинуклеотид кодирует полноразмерную каталитически активную форму определенного белка.

Как используется в данном документе, термин "антисмысловая", используемый в контексте ориентации нуклеотидной последовательности, относится к дуплексной последовательности полинуклеотида, которая функционально связана с промотором в такой ориентации, при которой транскрибируется антисмысловая нить. Антисмысловая нить является достаточно комплементарной эндогенному продукту транскрипции, так что трансляция эндогенного продукта транскрипции часто подавляется. Таким образом, при использовании термина "антисмысловая" в контексте конкретной нуклеотидной последовательности термин относится к комплементарной нити для эталонного продукта транскрипции.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применяются в отношении полимеров из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также в отношении полимеров из встречающихся в природе аминокислот.

Термины "остаток", или "аминокислотный остаток", или "аминокислота" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения аминокислоты, которая входит в состав белка, полипептида или пептида (в собирательном значении "белок"). Аминокислота может представлять собой встречающуюся в природе аминокислоту, и если не ограничено иным образом, она может охватывать известные аналоги природных аминокислот, которые могут функционировать подобно встречающимся в природе аминокислотам.

Полипептиды согласно вариантам осуществления можно получить либо из нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, либо посредством применения стандартных методик молекулярной биологии. Например, белок согласно вариантам осуществления можно получить путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления в соответствующей клетке-хозяине или, в качестве

альтернативы, с помощью комбинации процедур *ex vivo*.

Как используется в данном документе, термины "выделенный" и "очищенный" используются взаимозаменяемо для обозначения нуклеиновых кислот или полипептидов или их биологически активных частей, которые в существенной степени или по сути не содержат компонентов, которые обычно дополняют нуклеиновую кислоту или полипептид, обнаруживаемые в их природном окружении, или взаимодействуют с ними. Таким образом, выделенные или очищенные нуклеиновая кислота или полипептид в существенной степени не содержат другого клеточного материала или культуральной среды в случае, если их получают с помощью рекомбинантных методик, или в существенной степени не содержат химических предшественников или других химических веществ в случае, если их синтезируют химическим путем.

"Выделенная" нуклеиновая кислота обычно не содержит последовательностей (таких как, например, последовательности, кодирующие белок), которые в природных условиях фланкируют нуклеиновую кислоту (т. е. последовательности, расположенные на 5' и 3' концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. Например, в различных вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты могут содержать менее приблизительно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. или 0,1 т.о. нуклеотидных последовательностей, которые в природных условиях фланкируют нуклеиновые кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получена нуклеиновая кислота.

Как используется в данном документе, термины "выделенный" или "очищенный" при использовании для обозначения полипептида согласно вариантам осуществления означают, что выделенный белок в существенной степени не содержит клеточного материала и включает препараты белка, содержащие менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) загрязняющего белка. Если белок согласно вариантам осуществления или его биологически активная часть получены рекомбинантным способом, то в культуральной среде представлено менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) химических предшественников или химических веществ, не являющихся белком, представляющим интерес.

"Рекомбинантная" молекула нуклеиновой кислоты (или ДНК) используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая находится в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления "выделенная" или "рекомбинантная" нуклеиновая кислота не содержит последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белок), которые в природных условиях фланкируют нуклеиновую кислоту (т. е. последовательности, расположенные на 5' и 3' концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. Для целей настоящего изобретения выражения "выделенный" или "рекомбинантный" при использовании для обозначения молекул нуклеиновой кислоты исключают выделенные хромосомы.

Как используется в данном документе, "последовательность нуклеиновой кислоты, отличная от геномной" или "молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая характеризуется одним или несколькими изменениями в последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с нативной или геномной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изменение по отношению к нативной или геномной молекуле нуклеиновой кислоты включает без ограничения: изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие вырожденности генетического кода; оптимизацию кодонов в последовательности нуклеиновой кислоты для экспрессии в растениях; изменения в последовательности нуклеиновой кислоты для введения по меньшей мере одной аминокислотной замены, вставки, делеции и/или добавления по сравнению с нативной или геномной последовательностью; удаление одного или нескольких интронов, связанных с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку одного или нескольких гетерологичных интронов; делецию одного или нескольких регуляторных участков, расположенных выше или ниже, которые связаны с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку одного или нескольких гетерологичных регуляторных участков, расположенных выше или ниже; делецию 5'-и/или 3'-нетранслируемого участка, связанного с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку гетерологичного 5'- и/или 3'-нетранслируемого участка и модификацию сайта полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной, представляет собой кДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной, представляет собой синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты.

По всему описанию под словом "содержащий" или вариантами, такими как "содержит" или "содержащий", подразумевают включение приведенного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, при этом без исключения любого другого элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий.

Как используется в данном документе, термин "оказание воздействия на насекомых-вредителей" относится к обеспечению изменений в питании, росте и/или поведении насекомого на любой стадии развития, в том числе без ограничения к уничтожению насекомого; задержке роста; предотвращению возможности репродукции; антифидантной активности и т. п.

Как используется в данном документе, термины "пестицидная активность" и "инсектицидная активность" используются как синонимы для обозначения активности организма или вещества (такого как, например, белок), которую можно измерить без ограничения по смертности вредителя, потере веса вредителем, отпугиванию вредителя и другим поведенческим и физическим изменениям у вредителя после их скармливания и воздействия в течение соответствующего периода времени. Таким образом, организм или вещество, обладающие пестицидной активностью, оказывают отрицательное воздействие

в отношении по меньшей мере одного измеряемого параметра физического состояния вредителя. Например, "пестицидные белки" представляют собой белки, которые проявляют пестицидную активность сами по себе или в комбинации с другими белками.

Как используется в данном документе, термин "пестицидно эффективное количество" означает количество вещества или организма, которое оказывает пестицидную активность, когда присутствует в среде обитания вредителя. Для каждого вещества или организма пестицидно эффективное количество определяют эмпирически в отношении каждого вредителя, на которого оказывают воздействие в определенной среде. Аналогично, выражение "инсектицидно эффективное количество" может использоваться для обозначения "пестицидно эффективного количества", если вредитель представляет собой вредителя-насекомого.

Как используется в данном документе, термины "рекомбинантно сконструированный" или "сконструированный" означают использование технологии рекомбинантной ДНК для внесения (например, при конструировании) изменения в структуру белка на основании понимания структуры и/или механизма действия белка и учета особенностей аминокислот, подлежащих введению, удалению или замещению.

Как используется в данном документе, термины "мутантная нуклеотидная последовательность", или "мутация", или "подвергнутая мутагенезу нуклеотидная последовательность" означают нуклеотидную последовательность, которая была подвергнута мутагенезу или изменена таким образом, чтобы содержать один или несколько нуклеотидных остатков (например, пару оснований), которые не присутствуют в соответствующей последовательности дикого типа. Такой мутагенез или изменение состоят в одном или нескольких добавлениях, делециях, или заменах, или замещениях остатков нуклеиновой кислоты. Если мутации осуществляют посредством добавления, удаления или замещения аминокислоты в сайте протеолитического расщепления, то такие добавление, удаление или замещение могут находиться в пределах мотива с сайтом протеолитического расщепления или прилегать к нему при условии, что достигается цель мутации (т. е. при условии, что изменяется протеолиз по данному сайту).

Мутантная нуклеотидная последовательность может кодировать мутантный инсектицидный токсин, проявляющий улучшенную или пониженную инсектицидную активность, или аминокислотную последовательность, которая придает улучшенную или пониженную инсектицидную активность полипептиду, содержащему ее. Как используется в данном документе, термины "мутант" или "мутация" в контексте белка, полипептидной или аминокислотной последовательности относятся к последовательности, которая была подвергнута мутагенезу или изменена таким образом, чтобы содержать один или несколько аминокислотных остатков, которые не присутствуют в соответствующей последовательности дикого типа. Такой мутагенез или изменение состоят в одном или нескольких добавлениях, делециях, или заменах, или замещениях аминокислотных остатков. Мутантный полипептид проявляет улучшенную или пониженную инсектицидную активность или представляет собой аминокислотную последовательность,

которая придает улучшенную инсектицидную активность полипептиду, содержащему ее. Таким образом, термины "мутант" или "мутация" относятся к любому из мутантной нуклеотидной последовательности и кодируемых аминокислот или к ним обоим. Мутантов можно применять отдельно или в любой совместимой комбинации с другими мутантами согласно вариантам осуществления или с другими мутантами. "Мутантный полипептид" может, напротив, проявлять пониженную инсектицидную активность. Когда к конкретной нуклеиновой кислоте или к белку добавляют более одной мутации, мутации можно добавлять одновременно или последовательно; при этом если последовательно, то мутации можно добавлять в любом подходящем порядке.

Как используется в данном документе, термины "улучшенная инсектицидная активность" или "улучшенная пестицидная активность" относятся к инсектицидному полипептиду согласно вариантам осуществления, который обладает усиленной инсектицидной активностью по сравнению с активностью соответствующего ему белка дикого типа, и/или к инсектицидному полипептиду, который является эффективным против более широкого спектра насекомых, и/или к инсектицидному полипептиду, характеризующемуся специфичностью в отношении насекомого, которое не восприимчиво к токсичности белка дикого типа. Заключение об улучшенной или усиленной пестицидной активности требует демонстрации повышения пестицидной активности по меньшей мере на 10% против насекомого, являющегося мишенью, или повышения пестицидной активности по меньшей мере на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 100%, 150%, 200% или 300% или более по сравнению с пестицидной активностью инсектицидного полипептида дикого типа, определенной в отношении такого же насекомого.

Например, улучшенная пестицидная или инсектицидная активность обеспечивается в тех случаях, когда полипептид оказывает воздействие на более широкий или более узкий спектр насекомых по сравнению со спектром насекомых, на которых оказывает влияние токсин Bt дикого типа. Более широкий спектр воздействия может являться желательным в тех случаях, когда необходима универсальность, тогда как более узкий спектр воздействия может являться желательным в тех случаях, когда, например, в иных обстоятельствах полезные насекомые могут подвергаться воздействию при применении или присутствии токсина. Хотя варианты осуществления не привязаны к какому-либо конкретному механизму действия, улучшенную пестицидную активность также можно обеспечить посредством изменений одной или нескольких характеристик полипептида; например, можно увеличить стабильность или продолжительность существования полипептида в кишечнике насекомого по сравнению со стабильностью или продолжительностью существования соответствующего белка дикого типа.

Как используется в данном документе, термин "токсин" относится к полипептиду, проявляющему пестицидную активность, или инсектицидную активность, или улучшенную пестицидную активность, или улучшенную инсектицидную активность. Токсин "Bt" или "*Bacillus thuringiensis*", как предполагается, включает более широкий

класс токсинов Cry, обнаруживаемых у различных штаммов Bt, который включает такие токсины, как, например, Cry1, Cry2 или Cry3.

Термины "сайт протеолитического расщепления" или "сайт расщепления" относятся к аминокислотной последовательности, которая придает чувствительность к классу протеаз или конкретной протеазе таким образом, что полипептид, содержащий эту аминокислотную последовательность, расщепляется классом протеаз или конкретной протеазой. Считается, что сайт протеолитического расщепления является "чувствительным" к протеазе(протеазам), которая(которые) распознает(распознают) данный сайт. Из уровня техники известно, что эффективность расщепления будет варьировать и что снижение эффективности расщепления может привести к увеличению стабильности или продолжительности существования полипептида в кишечнике насекомого. Таким образом, сайт протеолитического расщепления может придавать чувствительность к более чем одной протеазе или классу протеаз, но эффективность расщепления по данному сайту может варьировать для различных протеаз. Сайты протеолитического расщепления включают, например, сайты для трипсина, сайты для химотрипсина и сайты для эластазы.

Исследование показало, что протеазы кишечника насекомого, относящегося к чешуекрылым, включают трипсины, химотрипсины и эластазы. См., например, Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212; и Hedegus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47. Например, в среднем отделе кишечника личинки *Helicoverpa armigera* было обнаружено приблизительно 18 различных трипсинов (см. Gatehouse et al. (1997) Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 929-944). Были выявлены предпочтительные сайты в субстратах для протеолитического расщепления этими протеазами. См., например, Peterson et al. (1995) Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 765-774.

Предпринимались попытки понять механизм действия токсинов Bt и сконструировать токсины с улучшенными свойствами. Было показано, что протеазы кишечника насекомого могут влиять на оказание воздействия белками Cry Bt на насекомое. Некоторые протеазы активируют белки Cry посредством их процессинга из формы "протоксина" в токсичную форму или "токсин". См., Oppert (1999) Arch. Insect Biochem. Phys. 42: 1-12; и Carroll et al. (1997) J. Invertebrate Pathology 70: 41-49. Эта активация токсина может включать удаление N- и C-концевых пептидов из белка, а также может включать внутреннее расщепление белка. Другие протеазы могут разлагать Cry белки. См., Oppert, там же.

При сравнении аминокислотных последовательностей токсинов Cry с различной специфичностью выявили пять высококонсервативных блоков последовательностей. Что касается структуры токсина содержат три различных домена, которые представляют собой, от N- до C-конца: кластер из семи альфа-спиралей, вовлеченных в образование пор (называемый "доменом 1"), три антипараллельных бета-складчатых слоя, вовлеченных в связывание с клетками (называемые "доменом 2") и бета-сэндвич (называемый "доменом 3"). Местоположение и свойства данных доменов известны специалистам в данной

области техники. См., например, Li et al. (1991) *Nature*, 305:815-821 и Morse et al. (2001) *Structure*, 9:409-417. Если упоминается конкретный домен, такой как домен I, то следует понимать, что точные пределы домена применительно к конкретной последовательности могут варьировать при условии, что последовательность или ее часть включает последовательность, которая обеспечивает по меньшей мере некоторую функцию, приписываемую конкретному домену. Таким образом, например, при упоминании "домена I" предполагается, что конкретная последовательность включает кластер из семи альфа-спиралей, но точные пределы последовательности, применяемой или относящейся к данному кластеру, могут варьировать. Специалисту в данной области техники знакомы определение таких пределов и оценка таких функций.

В попытке улучшить токсины Cry2B предпринимались усилия в отношении идентификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих кристаллические белки у выбранных штаммов, которые обладают улучшенной активностью по сравнению с нативным токсином. В зависимости от характеристик конкретного препарата считается, что демонстрация пестицидной активности иногда требует предварительной обработки трипсином для активации пестицидных белков. Таким образом, следует понимать, что некоторые пестицидные белки требуют расщепления протеазой (например, трипсином, химотрипсином и т. п.) для активации, тогда как другие белки являются биологически активными (например, пестицидными) в отсутствие активации.

Такие молекулы можно изменять с помощью средств, описанных, например, в патенте США № 7462760. Кроме того, последовательности нуклеиновой кислоты можно сконструировать таким образом, чтобы они кодировали полипептиды, которые содержат дополнительные мутации, придающие улучшенную или измененную пестицидную активность по сравнению с пестицидной активностью встречающегося в природе полипептида. Нуклеотидные последовательности таких сконструированных нуклеиновых кислот содержат мутации, не обнаруживаемые в последовательностях дикого типа.

Мутантные полипептиды согласно вариантам осуществления обычно получают посредством способа, который включает стадии: получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид семейства Cry; осуществления анализа структуры полипептида с идентификацией конкретных "целевых" сайтов для мутагенеза основоположной генной последовательности исходя из представлений о предполагаемой функции целевого домена в механизме действия токсина; введения одной или нескольких мутаций в последовательность нуклеиновой кислоты с получением требуемого изменения в одном или нескольких аминокислотных остатках кодируемой полипептидной последовательности; и осуществления анализа полученного полипептида в отношении пестицидной активности.

Многие из инсектицидных токсинов Vt являются родственными в различных степенях из-за сходств их аминокислотных последовательностей и третичной структуры, и при этом средства для получения кристаллических структур Vt токсинов являются хорошо известными. Иллюстративные решения кристаллической структуры с высоким

разрешением обоих полипептидов Cry3A и Cry3B доступны в литературе. Решенная структура Cry3A (Li et al. (1991) Nature 353:815-821) обеспечивает понимание взаимосвязи между структурой и функцией токсина. Совместное рассмотрение опубликованных анализов о структуре токсинов Bt и описанной функции, связанной с конкретными структурами, мотивами и т. п., указывает на то, что специфические участки токсина соотносятся с конкретными функциями и отдельными стадиями механизма действия белка. Например, многие токсины, выделенные из Bt, в целом описывают как содержащие три домена: пучок из семи спиралей, который вовлечен в образование пор, домен из трех складчатых слоев, который вовлечен в связывание с рецептором, и мотив бета-сэндвич (Li et al. (1991) Nature 305: 815-821).

Как описано в патентах США № 7105332 и № 7462760, токсичность белков Cry можно улучшить посредством целенаправленного воздействия на участок, расположенный между альфа-спиралями 3 и 4 в домене I токсина. Данная теория основывается на совокупности знаний, касающихся инсектицидных токсинов, в том числе: 1) о том, что альфа-спирали 4 и 5 в домене I токсинов Cry3A, как сообщалось, встраиваются в липидный бислой клеток, выстилающих средний отдел кишечника восприимчивых насекомых (Gazit et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12289-12294); 2) на знаниях авторов настоящего изобретения о местоположении сайтов расщепления трипсином и химотрипсином в аминокислотной последовательности белка дикого типа; 3) на наблюдении того, что белок дикого типа был более активным против определенных насекомых после активации *in vitro* посредством обработки трипсином или химотрипсином; и 4) на сообщениях о том, что расщепление токсинов с 3' конца приводило к пониженной токсичности в отношении насекомых.

Для создания новых полипептидов, обладающих усиленной или измененной пестицидной активностью, можно создать ряд мутаций и поместить в различные исходные последовательности. См., например, патент США № 7462760. Данные мутанты включают без ограничения: добавление по меньшей мере одного более чувствительного к протеазе сайта (например, сайта расщепления трипсином) в участок, расположенный между спиралью 3 и 4 в домене I; замещение исходного чувствительного к протеазе сайта в последовательности дикого типа отличным чувствительным к протеазе сайтом; добавление нескольких чувствительных к протеазе сайтов в конкретном местоположении; добавление аминокислотных остатков рядом с чувствительным(чувствительными) к протеазе сайтом(сайтами) для изменения укладки полипептида и усиления таким образом расщепления полипептида в чувствительном(чувствительных) к протеазе сайте(сайтах); и добавление мутаций для защиты полипептида от разрушающего расщепления, которое снижает токсичность (например, создание ряда мутаций, где аминокислоту дикого типа заменяют валином для защиты полипептида от расщепления). Мутации можно применять по отдельности или в любой комбинации для обеспечения полипептидов согласно вариантам осуществления.

Гомологичные последовательности идентифицировали посредством поиска

сходства в неизбыточной (nr) базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с применением BLAST и PSI-BLAST. Гомологичные белки состояли из токсинов Cry, преимущественно из *Bacillus thuringiensis*.

Мутация, которая представляет собой дополнительный или альтернативный чувствительный к протеазе сайт, может являться чувствительной в отношении нескольких классов протеаз, таких как сериновые протеазы, которые включают трипсин и химотрипсин, или таких ферментов, как эластаза. Таким образом, мутацию, которая представляет собой дополнительный или альтернативный чувствительный к протеазе сайт, можно сконструировать таким образом, чтобы сайт легко распознавался и/или расщеплялся определенной категорией протеаз, такой как протеазы млекопитающих или протеазы насекомых. Чувствительный к протеазе сайт также можно сконструировать таким образом, чтобы он расщеплялся конкретным классом ферментов или конкретным ферментом, который, как известно, вырабатывается в организме, таким как, например, химотрипсин, вырабатываемый у кукурузной совки *Heliothis zea* (Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212). Мутации также могут придавать устойчивость к протеолитическому расщеплению, например, к расщеплению химотрипсином по С-концу пептида.

Наличие дополнительного и/или альтернативного чувствительного к протеазе сайта в аминокислотной последовательности кодируемого полипептида может улучшить пестицидную активность и/или специфичность полипептида, кодируемого нуклеиновыми кислотами согласно вариантам осуществления. Соответственно, нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления могут быть рекомбинантно сконструированными или с ними могут быть произведены манипуляции для получения полипептидов, обладающих улучшенной или измененной инсектицидной активностью и/или специфичностью по сравнению с таковыми у немодифицированного токсина дикого типа. Кроме того, мутации, раскрытые в данном документе, можно поместить в другие нуклеотидные последовательности или применять в сочетании с ними для обеспечения улучшенных свойств. Например, чувствительный к протеазе сайт, который легко расщепляется химотрипсином насекомого, например, химотрипсином, обнаруженным у совки Берта или кукурузной совки (Hegedus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47; и Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212), можно поместить в исходную последовательность Cry для обеспечения улучшенной токсичности у этой последовательности. Таким образом, в вариантах осуществления предусмотрены токсичные полипептиды с улучшенными свойствами.

Например, подвергнутая мутагенезу нуклеотидная последовательность Cry может предусматривать дополнительные мутанты, которые содержат дополнительные кодоны, которые вводят вторую чувствительную к трипсину аминокислотную последовательность (дополнительно к встречающемуся в природе сайту для трипсина) в кодируемый полипептид. Альтернативный мутант с добавлением согласно вариантам осуществления содержит дополнительные кодоны, сконструированные для введения по меньшей мере

одного дополнительного отличающегося чувствительного к протеазе сайта в полипептид; например, чувствительного к химотрипсину сайта, расположенного непосредственно в направлении 5' или 3' от встречающегося в природе сайта для трипсина. В качестве альтернативы, можно создать мутантов с заменой, у которых по меньшей мере один кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует встречающийся в природе чувствительный к протеазе сайт, устранен, и в последовательность нуклеиновой кислоты введены альтернативные кодоны с целью обеспечения отличающегося (например, замененного) чувствительного к протеазе сайта. Мутанта с замещением также можно добавить к числу последовательностей Cry, у которого встречающийся в природе сайт расщепления трипсином, присутствующий в кодируемом полипептиде, устранен, и на его место введен сайт расщепления химотрипсином или эластазой.

Считается, что можно применять любую нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотные последовательности, которые представляют собой сайты протеолитического расщепления или предполагаемые сайты протеолитического расщепления (например, такие последовательности, как RR или LKM), и что точная идентичность кодонов, применяемых для введения любого из данных сайтов расщепления в вариантный полипептид, может варьировать в зависимости от применения, т. е. экспрессии в конкретном виде растений. Также считается, что любую из раскрытых мутаций можно ввести в любую последовательность полинуклеотида согласно вариантам осуществления, которая содержит кодоны для аминокислотных остатков, которые обеспечивают нативный сайт расщепления трипсином, который является мишенью для модификации. Соответственно, варианты полноразмерных токсинов либо их фрагментов можно модифицировать таким образом, чтобы они содержали дополнительные или альтернативные сайты расщепления, и предполагается, что данные варианты осуществления охватываются объемом вариантов осуществления, раскрытых в данном документе.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что любую применимую мутацию можно добавить в последовательности согласно вариантам осуществления при условии, что кодируемые полипептиды сохраняют пестицидную активность. Таким образом, последовательности также можно подвергнуть мутации таким образом, чтобы кодируемые полипептиды были устойчивы к протеолитическому расщеплению химотрипсином. Более одного сайта распознавания можно добавить в конкретном местоположении в любой комбинации, и при этом несколько сайтов распознавания можно добавить в токсин или удалить из него. Таким образом, дополнительные мутации могут включать три, четыре или более сайтов распознавания. Следует понимать, что несколько мутаций можно сконструировать в любой подходящей последовательности полинуклеотида; соответственно, полноразмерные последовательности либо их фрагменты можно модифицировать таким образом, чтобы они содержали дополнительные или альтернативные сайты расщепления, а также были устойчивы к протеолитическому расщеплению. Таким образом, в вариантах осуществления предусмотрены токсины Cry,

содержащие мутации, которые улучшают пестицидную активность, а также улучшенные композиции и способы для оказания воздействия на вредителей с применением других токсинов Bt.

Мутации могут защищать полипептид от разрушения протеазой, например, посредством удаления предполагаемых сайтов протеолитического расщепления, таких как предполагаемые сайты расщепления сериновой протеазой и сайты распознавания эластазой, из различных областей. Некоторые или все такие предполагаемые сайты можно удалить или изменить таким образом, чтобы снизить протеолиз в месте расположения исходного сайта. Изменения протеолиза можно оценить посредством сравнения мутантного полипептида с токсинами дикого типа или посредством сравнения мутантных токсинов, которые отличаются по их аминокислотной последовательности. Предполагаемые сайты протеолитического расщепления и сайты протеолитического расщепления включают без ограничения следующие последовательности: RR, сайт расщепления трипсином; LKM, сайт для химотрипсина; и сайт для трипсина. Данные сайты можно изменить посредством добавления или удаления любого числа и вида аминокислотных остатков при условии, что пестицидная активность полипептида повышается. Таким образом, полипептиды, кодируемые нуклеотидными последовательностями, содержащими мутации, будут содержать по меньшей мере одно изменение или добавление аминокислоты по сравнению с нативной или фоновой последовательностью или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 38, 40, 45, 47, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, или 280 или более изменений или добавлений аминокислоты. Пестицидную активность полипептида также можно улучшить посредством усечения нативной или полноразмерной последовательности, как известно из уровня техники.

Композиции согласно вариантам осуществления включают нуклеиновые кислоты и их фрагменты и варианты, которые кодируют пестицидные полипептиды. В частности, варианты осуществления предусматривают выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 45, или нуклеотидные последовательности, кодирующие указанную аминокислотную последовательность, например, нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46, а также их фрагменты и варианты.

В частности, в вариантах осуществления предусмотрены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8, или нуклеотидные последовательности, кодирующие указанную аминокислотную последовательность, например, нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, и SEQ ID NO: 46, а также их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полипептид под SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 или его варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полипептид под SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 или его варианты.

Интерес также представляют оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные белки согласно вариантам осуществления. Используемая в данном документе фраза "оптимизированные нуклеотидные последовательности" относится к нуклеиновым кислотам, которые являются оптимизированными для экспрессии в конкретном организме, например, в растении. Оптимизированные нуклеотидные последовательности можно получить для любого организма, представляющего интерес, с применением способов, известных из уровня техники. См., например, патент США № 7462760, в котором описана оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая раскрытый пестицидный белок. В данном примере нуклеотидную последовательность получали посредством "обратной трансляции" аминокислотной последовательности белка и изменения нуклеотидной последовательности с тем, чтобы она содержала предпочтительные для маиса кодоны, при

этом все еще кодировала ту же аминокислотную последовательность. Данная процедура более подробно описана в Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498. Оптимизированные нуклеотидные последовательности находят применение при повышении экспрессии пестицидного белка в растении, например, в однодольных растениях семейства Gramineae (Poaceae), таких как, например, растение маиса или кукурузы.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45, а также их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45, а также их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29, а также их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78, и их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129,

SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 144, и их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78, и их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 144, и их фрагменты и варианты.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены вариантные полипептиды Cry1B, имеющие аминокислотную замену по сравнению с соответствующим эталонным полипептидом Cry1B, которые обладают повышенной инсектицидной активностью против кукурузной совки и/или травяной совки по сравнению с "соответствующим эталонным полипептидом Cry1B". Под "соответствующим эталонным полипептидом Cry1B" подразумевают полипептид Cry1B дикого типа или нативный или вариантный полипептид Cry1B согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, который может служить в качестве аминокислотной последовательности, которую подвергают мутагенезу для создания вариантного полипептида Cry1B. В некоторых вариантах осуществления соответствующий эталонный полипептид Cry1B содержит домен I Cry1Be-типа и домен III Cry1Ah-типа. Под "доменом I Cry1Be-типа" подразумевают аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с

аминокислотами 36-276 из SEQ ID NO: 58 (Cry1Be) или аминокислотами 35-276 из SEQ ID NO: 47. Выравнивание аминокислотных последовательностей домена I Cry1Be (SEQ ID NO: 58) и MP258 (SEQ ID NO: 47) показано на фигуре 3. Аналогично, другие нативные полипептиды Cry1B можно выравнивать с Cry1Be (SEQ ID NO: 58) и MP258 (SEQ ID NO: 47) для идентификации других участков домена I Cry1Be-типа. Под "доменом III Cry1Ah-типа" подразумевают аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с аминокислотами 483-643 из SEQ ID NO: 61 (Cry1Ah) или 494-655 из SEQ ID NO: 47. Выравнивание аминокислотной последовательности домена III Cry1Ah (SEQ ID NO: 61), Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54), и MP258 (SEQ ID NO: 47) показано на фигуре 4. Аналогично, другие нативные полипептиды Cry1B можно выравнивать с Cry1Ah (SEQ ID NO: 61), Cry1Bd, Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54) и/или MP258 (SEQ ID NO: 47) для идентификации других участков домена III Cry1Ah-типа. В некоторых вариантах осуществления соответствующий эталонный полипептид Cry1B содержит домен I и домен II Cry1Ba-типа. Под "доменом I и доменом II Cry1Ba-типа" подразумевают аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с аминокислотами 30-489 из SEQ ID NO: 55 (Cry1Ba). Выравнивание аминокислотной последовательности домена I и домена II MP258 (SEQ ID NO: 47), Cry1Be (SEQ ID NO: 58), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54), Cry1Bg (SEQ ID NO: 60), Cry1Bf (SEQ ID NO: 59), Cry1Ba (SEQ ID NO: 55), Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), Cry1Bb (SEQ ID NO: 56), и Cry1Bc (SEQ ID NO: 57) показано на фигуре 5. Аналогично, другие нативные полипептиды Cry1B можно выравнивать с Cry1Ba (SEQ ID NO: 55) и MP258 (SEQ ID NO: 47) для идентификации других участков домена I и домена II Cry1Ba-типа.

В некоторых вариантах осуществления соответствующий эталонный полипептид Cry1B содержит домен I и домен II Cry1Be-типа. Под "доменом I и доменом II Cry1Be-типа" подразумевают аминокислотную последовательность, характеризующуюся по

меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с аминокислотами 35-494 из SEQ ID NO: 58 (Cry1Be) или аминокислотами 35-493 из SEQ ID NO: 47. Выравнивание аминокислотной последовательности домена I и домена II MP258 (SEQ ID NO: 47), Cry1Be (SEQ ID NO: 58), Cry1Bi (SEQ ID NO: 54), Cry1Bg (SEQ ID NO: 60), Cry1Bf (SEQ ID NO: 59), Cry1Ba (SEQ ID NO: 55), Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), Cry1Bb (SEQ ID NO: 56), и Cry1Bc (SEQ ID NO: 57) показано на фигуре 5. Аналогично, другие нативные полипептиды Cry1B можно выравнивать с Cry1Be (SEQ ID NO: 58) и MP258 (SEQ ID NO: 47) для идентификации других участков домена I и домена II Cry1Be-типа.

Под "улучшенной активностью" или "повышенной активностью" подразумевают повышение по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 100%, по меньшей мере на приблизительно 110%, по меньшей мере на приблизительно 120%, по меньшей мере на приблизительно 130%, по меньшей мере на приблизительно 140%, по меньшей мере на приблизительно 150%, по меньшей мере на приблизительно 160%, по меньшей мере на приблизительно 170%, по меньшей мере на приблизительно 180%, по меньшей мере на приблизительно 190%, по меньшей мере на приблизительно 200%, по меньшей мере на приблизительно 210%, по меньшей мере на приблизительно 220%, по меньшей мере на приблизительно 230%, по меньшей мере на приблизительно 240%, по меньшей мере на приблизительно 250%, по меньшей мере на приблизительно 260%, по меньшей мере на приблизительно 270%, по меньшей мере на приблизительно 280%, по меньшей мере на приблизительно 290%, по меньшей мере на приблизительно 300%, по меньшей мере на приблизительно 310%, по меньшей мере на приблизительно 320%, по меньшей мере на приблизительно 330%, по меньшей мере на приблизительно 340%, по меньшей мере на приблизительно 350%, по меньшей мере на приблизительно 360%, по меньшей мере на приблизительно 370%, по меньшей мере на приблизительно 380%, по меньшей мере на приблизительно 390%, по меньшей мере на приблизительно 400%, по меньшей мере на приблизительно 410%, по меньшей мере на приблизительно 420%, по меньшей мере на

[illegible]

меньшей мере в приблизительно 280 раз, по меньшей мере в приблизительно 290 раз, по меньшей мере в приблизительно 300 раз, по меньшей мере в приблизительно 350 раз, по меньшей мере в приблизительно 400 раз, по меньшей мере в приблизительно 450 раз, по меньшей мере в приблизительно 500 раз, по меньшей мере в приблизительно 550 раз, по меньшей мере в приблизительно 600 раз, по меньшей мере в приблизительно 650 раз, по меньшей мере в приблизительно 700 раз или более высокое повышение пестицидной активности вариантного белка по сравнению с активностью соответствующего эталонного полипептида Cry1B.

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления IC50 вариантного полипептида Cru1B составляет <100 ppm, <90 ppm, <80 ppm, <70 ppm, <60 ppm, <50 ppm, <45 ppm, <40 ppm, <35 ppm, <30 ppm, <25 ppm, <20 ppm, <19 ppm, <18 ppm, <17 ppm, <16 ppm, <15 ppm, <14 ppm, <13 ppm, <12 ppm, <11 ppm, <10 ppm, <9 ppm, <8 ppm, <7 ppm, <6 ppm, <5 ppm, <4 ppm, <3 ppm, <2 ppm, <1 ppm, <0,9 ppm, <0,8 ppm, <0,7 ppm, <0,6 ppm, <0,5 ppm, <0,4 ppm, <0,3 ppm, <0,2 ppm или <0,1 ppm.

[illegible]

[illegible]

"Среднее значение индекса FAE" (MFI) относится к среднему значению для множества FAEGN, среднему арифметическому значению FAEGN. Как используется в

данном документе, "среднее значение показателя отклонения" относится к среднему арифметическому значению для множества показателей отклонения.

[illegible]

меньшей мере в приблизительно 2 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 3 раза, по меньшей мере в приблизительно 3,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 4 раза, по меньшей мере в приблизительно 4,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 5 раз, по меньшей мере в приблизительно 5,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 6 раз, по меньшей мере в приблизительно 6,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 7 раз, по меньшей мере в приблизительно 7,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 8 раз, по меньшей мере в приблизительно 8,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 9 раз, по меньшей мере в приблизительно 9,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 10 раз, по меньшей мере в приблизительно 15 раз, по меньшей мере в приблизительно 20 раз, по меньшей мере в приблизительно 25 раз, по меньшей мере в приблизительно 30 раз, по меньшей мере в приблизительно 35 раз, по меньшей мере в приблизительно 40 раз, по меньшей мере в приблизительно 45 раз, по меньшей мере в приблизительно 50 раз, по меньшей мере в приблизительно 55 раз, по меньшей мере в приблизительно 60 раз, по меньшей мере в приблизительно 65 раз, по меньшей мере в приблизительно 70 раз, по меньшей мере в приблизительно 75 раз, по меньшей мере в приблизительно 80 раз, по меньшей мере в приблизительно 85 раз, по меньшей мере в приблизительно 90 раз, по меньшей мере в приблизительно 95 раз, по меньшей мере в приблизительно 100 раз, по меньшей мере в приблизительно 110 раз, по меньшей мере в приблизительно 120 раз, по меньшей мере в приблизительно 130 раз, по меньшей мере в приблизительно 140 раз, по меньшей мере в приблизительно 150 раз, по меньшей мере в приблизительно 160 раз, по меньшей мере в приблизительно 170 раз, по меньшей мере в приблизительно 180 раз, по меньшей мере в приблизительно 190 раз, по меньшей мере в приблизительно 200 раз, по меньшей мере в приблизительно 210 раз, по меньшей мере в приблизительно 220 раз, по меньшей мере в приблизительно 230 раз, по меньшей мере в приблизительно 240 раз, по меньшей мере в приблизительно 250 раз, по меньшей мере в приблизительно 260 раз, по меньшей мере в приблизительно 270 раз, по меньшей мере в приблизительно 280 раз, по меньшей мере в приблизительно 290 раз, по меньшей мере в приблизительно 300 раз, по меньшей мере в приблизительно 350 раз, по меньшей мере в приблизительно 400 раз, по меньшей мере в приблизительно 450 раз, по меньшей мере в приблизительно 500 раз, по меньшей мере в приблизительно 550 раз, по меньшей мере в приблизительно 600 раз, по меньшей мере в приблизительно 650 раз, по меньшей мере в приблизительно 700 раз или большем повышении среднего значения показателя отклонения вариантного полипептида Cry1B по сравнению с пестицидной активностью соответствующего эталонного полипептида Cry1B.

В некоторых вариантах осуществления активность вариантного полипептида Cry1B является улучшенной по сравнению с пестицидной активностью SEQ ID NO: 1 (Cry1Bd), SEQ ID NO: 47 (MP258), SEQ ID NO: 52 (Cry1Bh), SEQ ID NO: 54 (Cry1Bi), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43

или SEQ ID NO: 45.

В конкретных вариантах осуществления пестицидные белки согласно вариантам осуществления предусматривают полноразмерные инсектицидные полипептиды, фрагменты полноразмерных инсектицидных полипептидов и варианты полипептиды, полученные из подвергнутых мутагенезу нуклеиновых кислот, сконструированных для введения конкретных аминокислотных последовательностей в полипептиды согласно вариантам осуществления. В конкретных вариантах осуществления аминокислотные последовательности, которые вводят в полипептиды, содержат последовательность, которая обеспечивает сайт расщепления для фермента, такого как протеаза.

Из уровня техники известно, что пестицидная активность токсинов Bt, как правило, активируется посредством расщепления пептида в кишечнике насекомого различными протеазами. Поскольку пептиды не всегда могут быть расщеплены в кишечнике насекомого с полной эффективностью, фрагменты полноразмерного токсина могут обладать усиленной пестицидной активностью по сравнению с самим полноразмерным токсином. Таким образом, некоторые из полипептидов согласно вариантам осуществления включают фрагменты полноразмерного инсектицидного полипептида, и некоторые из фрагментов, вариантов и мутантных форм полипептида будут обладать усиленной пестицидной активностью по сравнению с активностью встречающегося в природе инсектицидного полипептида, из которого их получили, в частности, если встречающийся в природе инсектицидный полипептид не активировали *in vitro* с помощью протеазы перед скринингом в отношении активности. Таким образом, настоящая заявка охватывает усеченные варианты или фрагменты последовательностей.

Мутации можно поместить в любую исходную последовательность, в том числе такие усеченные полипептиды, при условии, что полипептид сохраняет пестицидную активность. Специалист в данной области техники может легко сравнить два или более белков в отношении пестицидной активности с применением анализов, известных из уровня техники или описанных в других местах в данном документе. Следует понимать, что полипептиды согласно вариантам осуществления можно получить либо посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, либо посредством применения стандартных методик молекулярной биологии.

Считается, что пестицидные белки могут являться олигомерными и будут отличаться по молекулярной массе, числу остатков, составляющим пептидам, активности против конкретных вредителей и другим характеристикам. Тем не менее, посредством способов, изложенных в данном документе, можно выделить и охарактеризовать белки, активные против ряда вредителей. Пестицидные белки согласно вариантам осуществления можно применять в комбинации с другими токсинами Bt или другими инсектицидными белками для расширения спектра насекомых-мишеней. Более того, применение пестицидных белков согласно вариантам осуществления в комбинации с другими токсинами Bt или другими инсектицидными активными компонентами отличной природы является особенно полезным для предотвращения и/или сдерживания развития

устойчивости у насекомых. Другие инсектицидные средства включают ингибиторы протеаз (как серинового, так и цистеинового типов), α -амилазу и пероксидазу.

Фрагменты и варианты нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и полипептидов, кодируемых ими, также охватываются вариантами осуществления. Как используется в данном документе, термин "фрагмент" относится к части нуклеотидной последовательности полинуклеотида или к части аминокислотной последовательности полипептида согласно вариантам осуществления. Фрагменты нуклеотидной последовательности могут кодировать фрагменты белка, которые сохраняют биологическую активность нативного или соответствующего полноразмерного белка и, следовательно, обладают пестицидной активностью. Таким образом, считается, что некоторые из полинуклеотидных и аминокислотных последовательностей согласно вариантам осуществления можно справедливо называть как фрагментами, так и мутантами.

Следует понимать, что термин "фрагмент" при использовании для обозначения последовательностей нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления также охватывает последовательности, которые являются применимыми в качестве гибридизационных зондов. Нуклеотидные последовательности из этого класса обычно не кодируют фрагменты белков, сохраняющие биологическую активность. Таким образом, фрагменты нуклеотидной последовательности могут варьировать в диапазоне от по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов до полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей белки согласно вариантам осуществления.

Фрагмент нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления, который кодирует биологически активную часть пестицидного белка согласно вариантам осуществления, будет кодировать по меньшей мере 15, 25, 30, 50, 100, 200, 250 или 300 смежных аминокислот или вплоть до общего числа аминокислот, присутствующих в пестицидном полипептиде согласно вариантам осуществления (например, 651 аминокислоту для SEQ ID NO: 3). Таким образом, следует понимать, что варианты осуществления также охватывают полипептиды, которые представляют собой фрагменты иллюстративных пестицидных белков согласно вариантам осуществления и имеют длину, составляющую по меньшей мере 15, 25, 30, 50, 100, 200, 250 или 300 смежных аминокислот или вплоть до общего числа аминокислот, присутствующих в пестицидном полипептиде согласно вариантам осуществления (например, 651 аминокислоту для SEQ ID NO: 3). От фрагментов нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления, которые являются применимыми в качестве гибридизационных зондов или ПЦР-праймеров, обычно не требуется, чтобы они кодировали биологически активную часть пестицидного белка. Таким образом, фрагмент нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления может кодировать биологически активную часть пестицидного белка или он может представлять собой фрагмент, который можно применять в качестве гибридизационного зонда или ПЦР-праймера с применением способов, раскрытых в

данном документе. Биологически активную часть пестицидного белка можно получить посредством выделения части одной из нуклеотидных последовательностей согласно вариантам осуществления, обеспечении экспрессии кодируемой части пестицидного белка (например, посредством рекомбинантной экспрессии *in vitro*) и оценки активности кодируемой части пестицидного белка.

Нуклеиновые кислоты, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления, содержат по меньшей мере 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 850, 900 или 950 нуклеотидов или до числа нуклеотидов, присутствующих в нуклеотидной последовательности, раскрытой в данном документе (например, 1953 нуклеотидов для SEQ ID NO: 4). В конкретных вариантах осуществления предусмотрены фрагменты, происходящие из (например, полученные из) первой нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления, где фрагмент кодирует усеченный токсин, обладающий пестицидной активностью. Усеченные полипептиды, кодируемые фрагментами полинуклеотида согласно вариантам осуществления, обладают пестицидной активностью, которая является либо эквивалентной, либо улучшенной по сравнению с активностью соответствующего полноразмерного полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, из которой получили фрагмент. Предусматривается, что такие фрагменты нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления могут быть усечены по 3'-концу нативной или соответствующей полноразмерной кодирующей последовательности. Фрагменты нуклеиновой кислоты также могут быть усечены как по 5'-, так и по 3'-концу нативной или соответствующей полноразмерной кодирующей последовательности.

Термин "варианты" используется в данном документе для обозначения существенно сходных последовательностей. Для нуклеотидных последовательностей консервативные варианты включают такие последовательности, которые из-за вырожденности генетического кода кодируют аминокислотную последовательность одного из пестицидных полипептидов согласно вариантам осуществления. Специалисты в данной области техники легко поймут, что вследствие вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, отличную от геномной. Как используется в данном документе, "последовательность нуклеиновой кислоты, отличная от геномной", или "молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной", или "полинуклеотид, отличный от геномного" обозначают молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую одно или несколько изменений в последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с нативной или геномной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изменение по отношению к нативной или геномной молекуле нуклеиновой кислоты включает без ограничения: изменения в последовательности нуклеиновой кислоты

вследствие вырожденности генетического кода; оптимизацию кодонов в последовательности нуклеиновой кислоты для экспрессии в растениях; изменения в последовательности нуклеиновой кислоты для введения по меньшей мере одной аминокислотной замены, вставки, делеции и/или добавления по сравнению с нативной или геномной последовательностью; удаление одного или нескольких интронов, связанных с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку одного или нескольких гетерологичных интронов; делецию одного или нескольких регуляторных участков, расположенных выше или ниже, которые связаны с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку одного или нескольких гетерологичных регуляторных участков, расположенных выше или ниже; делецию 5'-и/или 3'-нетранслируемого участка, связанного с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты; вставку гетерологичного 5'- и/или 3'-нетранслируемого участка и модификацию сайта полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной, представляет собой кДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, отличная от геномной, представляет собой синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты.

При необходимости нуклеиновую кислоту можно оптимизировать для повышения экспрессии в организме-хозяине. Таким образом, если организм-хозяин представляет собой растение, то для улучшенной экспрессии можно синтезировать синтетические нуклеиновые кислоты с применением предпочтительных для растения кодонов. См., например, Campbell and Gowri, (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 для обзора применения кодонов, предпочтительных для хозяина. Например, хотя последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления могут экспрессироваться у видов как однодольных, так и двудольных растений, последовательности можно модифицировать с учетом специфических предпочтений кодонов и предпочтений по содержанию GC у однодольных или двудольных, если было показано, что предпочтения отличаются (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Таким образом, предпочтительный для маиса кодон для конкретной аминокислоты можно получить из известных генных последовательностей маиса. Данные о применении кодонов маиса для 28 генов из растений маиса приведены в таблице 4 из Murray, et al., упоминаемого выше. Из уровня техники доступны способы синтеза генов, предпочтительных для растений. Таблицу применения кодонов *Zea mays* также можно найти на сайте kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577, доступ к которому можно получить с применением приставки www.

Таблица применения кодонов *Glycine max* показана в виде таблицы 3, и ее также можно найти на сайте kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847&aa=1&style=N, доступ к которому можно получить с применением приставки www.

Специалисту в данной области техники будет дополнительно понятно, что изменения можно вводить посредством внесения мутаций в последовательности

нуклеиновой кислоты, что тем самым приводит к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых полипептидов без изменения биологической активности белков. Таким образом, вариантные молекулы нуклеиновой кислоты можно создавать посредством введения одной или нескольких нуклеотидных замен, добавлений и/или делеций в соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, так что одна или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций вводятся в кодируемый белок. Мутации можно вводить посредством стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие вариантные последовательности нуклеиновой кислоты также охватываются настоящим изобретением.

Встречающиеся в природе аллельные варианты, такие как эти, можно идентифицировать с помощью хорошо известных методик молекулярной биологии, таких как, например, методики, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), и гибридизационные методики, как изложено в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, отличающуюся от геномной.

Вариантные нуклеотидные последовательности также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетическим способом, такие как нуклеотидные последовательности, полученные, например, посредством применения сайт-направленного мутагенеза, но которые все еще кодируют пестицидный белок согласно вариантам осуществления, такой как мутантный токсин. В целом, варианты конкретной нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления будут иметь последовательность, на по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или больше идентичную конкретной нуклеотидной последовательности при определении с помощью программ для выравнивания последовательностей, описанных в других местах в данном документе, с использованием параметров по умолчанию. Вариант нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления может отличаться от данной последовательности лишь 1-15 нуклеотидами, лишь 1-10, как например, 6-10, лишь 5, лишь 4, 3, 2 или даже 1 нуклеотидом.

Варианты конкретной нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления (т. е. иллюстративной нуклеотидной последовательности) также можно оценивать посредством сравнения процентной идентичности последовательностей полипептида, кодируемого вариантной нуклеотидной последовательностью, и полипептида, кодируемого эталонной нуклеотидной последовательностью. Таким

образом, например, раскрыты выделенные нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептид с указанной процентной идентичностью последовательности по отношению к полипептидам с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45. Процентную идентичность последовательностей для любых двух полипептидов можно рассчитать с применением программ для выравнивания последовательностей, описанных в других местах в данном документе, с применением параметров по умолчанию. При оценке любой конкретной пары полинуклеотидов согласно вариантам осуществления посредством сравнения процентной идентичности последовательностей, общей для двух полипептидов, которые они кодируют, процентная идентичность последовательностей двух кодируемых полипептидов составляет по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, обычно по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или по меньшей мере приблизительно 98%, 99% или большую степень идентичности последовательностей.

Как используется в данном документе, термин "вариантный белок" охватывает полипептиды, которые получены из нативного белка посредством: делеции (так называемого усечения) или добавления одной или нескольких аминокислот на N-конце и/или C-конце нативного белка; делеции или добавления одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких сайтах в нативном белке; или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких сайтах в нативном белке. Соответственно, термин "вариантный белок" охватывает биологически активные фрагменты нативного белка, которые содержат достаточное количество смежных аминокислотных остатков для сохранения биологической активности нативного белка, т. е. для обладания пестицидной активностью. Такая пестицидная активность может являться отличающейся или улучшенной по сравнению с нативным белком, или она может являться неизменной при условии, что пестицидная активность сохраняется.

Вариантные белки, охватываемые вариантами осуществления, являются биологически активными, то есть они продолжают обладать требуемой биологической активностью нативного белка, то есть пестицидной активностью, как описано в данном документе. Такие варианты могут быть результатом, например, генетического полиморфизма или манипуляции, осуществляемой человеком. Биологически активные варианты нативного пестицидного белка согласно вариантам осуществления будут иметь последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичную аминокислотной последовательности для нативного белка при определении с помощью программ для выравнивания последовательностей, описанных в других местах в данном документе, с использованием параметров по умолчанию. Биологически активный

вариант белка согласно вариантам осуществления может отличаться от данного белка лишь 1-15 аминокислотными остатками, лишь 1-10, как например, 6-10, лишь 5, лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

В некотором варианте осуществления инсектицидный полипептид по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или больше идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 45.

В некотором варианте осуществления инсектицидный полипептид по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или больше идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78.

В некотором варианте осуществления инсектицидный полипептид по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или больше идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 144.

В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется модифицированным физическим свойством. Как используется в данном документе, термин "физическое свойство" относится к любому параметру, который подходит для описания физико-химических характеристик белка. Как используется в данном документе, выражения "физическое свойство, представляющее интерес" и "свойство, представляющее интерес" используются взаимозаменяемо для обозначения физических свойств белков,

которые исследуют и/или модифицируют. Примеры физических свойств включают без ограничения суммарный поверхностный заряд и распределение зарядов на поверхности белка, суммарную гидрофобность и распределение гидрофобных остатков на поверхности белка, плотность поверхностного заряда, плотность гидрофобности поверхности, общее число поверхностных ионизируемых групп, поверхностное натяжение, размер белка и его распределение в растворе, температуру плавления, теплоемкость и второй вириальный коэффициент. Примеры физических свойств также включают без ограничения растворимость, укладку, стабильность и усвояемость. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется повышенной усвояемостью фрагментов, полученных в результате протеолитического расщепления, в кишечнике насекомого. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется повышенной стабильностью в кишечнике насекомого. Модели для расщепления посредством искусственного желудочного сока известны специалисту в данной области техники (Fuchs, R.L. and J.D. Astwood. *Food Technology* 50: 83-88, 1996; Astwood, J.D., et al *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273, 1996; Fu TJ et al *J. Agric Food Chem.* 50: 7154-7160, 2002).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I первого полипептида Cry1B и домен II и домен III второго полипептида Cry1B. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) и домен II и домен III из MP258 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I из MP258 (SEQ ID NO: 47) и домен II и домен III из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен II первого полипептида Cry1B и домен I и домен III второго полипептида Cry1B. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен II из MP258 (SEQ ID NO: 47), домен I и домен III из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен II из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), домен I и домен III из MP258 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I, домен II и домен III первого полипептида Cry1B, где одна, две или три альфа-спирали домена I замещены соответствующими альфа-спиралями второго полипептида Cry1B. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I, домен II и домен III из полипептида Cry1B, где одна, две или три альфа-спирали домена I замещены соответствующими альфа-спиралями из MP258 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I, домен II и домен III из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), где одна, две или три альфа-спирали домена I замещены соответствующими альфа-спиралями из MP258 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления предусмотрены химерные полипептиды Cry1B, содержащие домен I,

домен II и домен III из MP258 (SEQ ID NO: 47), где одна, две или три альфа-спирали домена I замещены соответствующими альфа-спиралями из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид Cry1B содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159 или SEQ ID NO: 160.

Варианты осуществления дополнительно охватывают микроорганизм, который трансформирован с помощью по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления, с помощью кассеты экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту, или с помощью вектора, содержащего кассету экспрессии. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм представляет собой микроорганизм, размножающийся на растениях. Вариант осуществления настоящего изобретения относится к инкапсулированному пестицидному белку, который содержится в трансформированном микроорганизме, способном к экспрессии по меньшей мере одного пестицидного белка согласно вариантам осуществления.

В вариантах осуществления предусмотрены пестицидные композиции, содержащие трансформированный микроорганизм согласно вариантам осуществления. В таких вариантах осуществления трансформированный микроорганизм обычно присутствует в пестицидной композиции в пестицидно эффективном количестве вместе с подходящим носителем. Варианты осуществления также охватывают пестицидные композиции, содержащие выделенный белок согласно вариантам осуществления отдельно или в комбинации с трансформированным организмом согласно вариантам осуществления и/или инкапсулированный пестицидный белок согласно вариантам осуществления в инсектицидно эффективном количестве вместе с подходящим носителем.

В вариантах осуществления дополнительно предусмотрен способ расширения спектра насекомых-мишеней посредством применения пестицидного белка согласно вариантам осуществления в комбинации с по меньшей мере одним другим или "вторым" пестицидным белком. В способах согласно вариантам осуществления можно использовать любой пестицидный белок, известный из уровня техники. Такие пестицидные белки включают без ограничения токсины Bt, ингибиторы протеаз, α -амилазы и пероксидазы.

Варианты осуществления также охватывают трансформированные или трансгенные растения, содержащие по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность согласно вариантам осуществления. В некоторых вариантах осуществления растение является стабильно трансформированным с помощью нуклеотидной конструкции, содержащей по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность согласно вариантам осуществления, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в клетке растения. Как используется в данном документе, термины "трансформированное растение" и "трансгенное растение" относятся к растению, которое содержит в своем геноме гетерологичный полинуклеотид.

В целом гетерологичный полинуклеотид стабильно интегрирован в геном трансгенного или трансформированного растения таким образом, что полинуклеотид передается последующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может быть интегрирован в геном отдельно или в виде части рекомбинантной кассеты экспрессии.

Следует понимать, что используемый в данном документе термин "трансгенный" включает любую клетку, линию клеток, каллус, ткань, часть растения или растение, генотип которого был изменен за счет присутствия гетерологичной нуклеиновой кислоты, в том числе такие трансгенные объекты, которые изначально были изменены таким образом, а также такие трансгенные объекты, которые были созданы посредством половых скрещиваний или бесполого размножения из исходного трансгенного объекта. Используемый в данном документе термин "трансгенный" не охватывает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) посредством традиционных способов селекции растений или посредством встречающихся в природе событий, таких как случайное перекрестное опыление, инфекция, вызванная нерекомбинантным вирусом, трансформация нерекомбинантными бактериями, нерекомбинационная транспозиция или спонтанная мутация.

Как используется в данном документе, термин "растение" включает целые растения, органы растений (например, листья, стебли, корни и т. д.), семена, клетки растений и их потомство. Части трансгенных растений находятся в пределах объема вариантов осуществления и включают, например, клетки растений, протопласты растений, культуры клеток тканей растений, из которых можно регенерировать растения, каллюсы растений, скопления клеток растений и клетки растений, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, листья, цветки, ветви, плоды, зерна, колоски, стержни початков, шелуха, стебли, корни, верхушки корней, пыльники и т. п., происходящих из трансгенных растений или их потомства, ранее трансформированных с помощью молекулы ДНК согласно вариантам осуществления и, таким образом, по меньшей мере частично состоящих из трансгенных клеток. Класс растений, которые можно применять в способах согласно вариантам осуществления, обычно настолько же широк, как и класс высших растений, поддающихся методикам трансформации, включающий как однодольные, так и двудольные растения.

Хотя варианты осуществления не зависят от конкретного биологического механизма повышения устойчивости растения к вредителю растений, экспрессия нуклеотидных последовательностей согласно вариантам осуществления в растении может приводить в результате к выработке пестицидных белков согласно вариантам осуществления и к повышению устойчивости растения к вредителю растений. Растения согласно вариантам осуществления находят применение в сельском хозяйстве в способах оказания воздействия на насекомых-вредителей. В определенных вариантах осуществления предусмотрены трансформированные культурные растения, такие как, например, растения маиса, которые находят применение в способах оказания воздействия на насекомых-вредителей растения, таких как, например, чешуекрылые вредители.

"Исследуемое растение или клетка растения" представляют собой растение или клетку растения, в которых генетическое изменение, такое как трансформация, повлияло на ген, представляющий интерес, или представляют собой растение или клетку растения, которые происходят от растения или клетки, измененных таким образом, и которые содержат изменение. "Контроль", или "контрольное растение", или "контрольная клетка растения" обеспечивают точку отсчета для измерения изменений фенотипа исследуемого растения или клетки растения.

Контрольное растение или клетка растения могут включать, например: (а) растение или клетку дикого типа, т. е. с тем же генотипом, что и у исходного материала для генетического изменения, из которого в результате получают исследуемое растение или клетку; (b) растение или клетку растения с тем же генотипом, что и у исходного материала, которые однако трансформировали с помощью нулевой конструкции (т. е. с помощью конструкции, которая не оказывает известного эффекта в отношении представляющего интерес признака, такой как конструкция, содержащая маркерный ген); (с) растение или клетку растения, которые представляют собой нетрансформированный сегрегант среди потомства исследуемых растения или клетки растения; (d) растение или клетку растения, генетически идентичные исследуемому растению или клетке растения, которые однако не подвергались воздействию условий или стимулов, которые бы индуцировали экспрессию гена, представляющего интерес; или (е) исследуемое растение или клетку растения как таковые в условиях, при которых ген, представляющий интерес, не экспрессируется.

Специалист в данной области техники легко поймет, что достижения в области молекулярной биологии, такие как сайт-специфический и случайный мутагенез, методики полимеразной цепной реакции и методики белковой инженерии, обеспечивают богатый набор инструментов и протоколов, подходящих для применения с целью изменения или конструирования как аминокислотной последовательности, так и основоположных генетических последовательностей белков, представляющих интерес с точки зрения сельского хозяйства.

Таким образом, белки согласно вариантам осуществления можно изменять различными способами, в том числе посредством аминокислотных замен, делеций, усечений и вставок. В целом способы осуществления таких манипуляций известны из уровня техники. Например, варианты аминокислотных последовательностей пестицидных белков можно получить посредством введения мутаций в синтетическую нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК). Способы мутагенеза и внесения изменений в нуклеиновую кислоту хорошо известны из уровня техники. Например, сконструированные изменения можно вводить с применением методики опосредованного олигонуклеотидами сайт-направленного мутагенеза. См., например, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; патент США № 4873192; Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) и ссылки, цитируемые в них.

Подвергаемые мутагенезу нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно модифицировать так, чтобы изменить приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 или более аминокислот, присутствующих в исходной последовательности кодируемого полипептида. В качестве альтернативы, в нативную последовательность можно ввести даже больше изменений таким образом, чтобы у кодируемого белка по меньшей мере приблизительно 1% или 2%, или приблизительно 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, или даже приблизительно 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, или 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, или 25%, 30%, 35%, или 40% или более кодонов могли быть измененными или иным образом модифицированными по сравнению с соответствующим белком дикого типа. Таким же образом, кодируемый белок может иметь по меньшей мере приблизительно 1% или 2%, или приблизительно 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, или даже приблизительно 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, или 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, или 25%, 30%, 35%, или 40% или более дополнительных кодонов по сравнению с соответствующим белком дикого типа. Следует понимать, что подвергнутые мутагенезу нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления, как предполагается, охватывают биологически функциональные эквивалентные пептиды, которые обладают пестицидной активностью, такой как улучшенная пестицидная активность, которую определяют по антифидантным свойствам в отношении личинок кукурузного мотылька. Такие последовательности могут возникнуть как следствие избыточности кодонов и функциональной эквивалентности, которые, как известно, встречаются в природе в последовательностях нуклеиновой кислоты и, таким образом, кодируемых белках.

Специалист в данной области техники поймет, что аминокислотные добавления и/или замены обычно основываются на относительном сходстве заместителей в боковой цепи аминокислот, например, их гидрофобности, заряда, размера и т. п. Иллюстративные группы аминокислотных замен, в которых принимаются во внимание несколько из вышеизложенных характеристик, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

Указания в отношении подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность белка, представляющего интерес, можно найти в модели Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включенной в данный документ посредством ссылки. Можно осуществлять консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты на другую, характеризующуюся подобными свойствами.

Таким образом, гены и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления включают как встречающиеся в природе последовательности, так и мутантные формы. Аналогично белки согласно вариантам осуществления охватывают как встречающиеся в природе белки и варианты (например, усеченные полипептиды), так и их модифицированные (например, мутантные) формы. Такие варианты будут продолжать

обладать требуемой пестицидной активностью. Очевидно, что мутации, которые будут осуществлять в нуклеотидной последовательности, кодирующей вариант, не должны выводить последовательность из рамки считывания и в целом не будут создавать комплементарные участки, которые могут образовать вторичную структуру мРНК. См. публикацию заявки на европейский патент № 75444.

Ожидается, что делеции, вставки и замены в белковых последовательностях, охватываемых данным документом, не обеспечат радикальных изменений в характеристиках белка. Тем не менее, если трудно предсказать точный эффект замены, делеции и вставки перед ее осуществлением, специалист в данной области техники поймет, что данный эффект будет оценен посредством обычных скрининговых анализов, таких как анализы со вскармливанием насекомым. См., например, Marrone et al. (1985) J. Econ. Entomol. 78: 290-293 и Czapla и Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485, включенные в данный документ посредством ссылки.

Вариантные нуклеотидные последовательности и белки также охватывают последовательности и белки, полученные посредством методики, связанной с мутагенезом и/или рекомбинацией, такой как ДНК-шаффлинг. С помощью такой процедуры можно осуществлять манипуляции с одной или несколькими различными кодирующими последовательностями для создания нового пестицидного белка, обладающего требуемыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов получают из популяции родственных по последовательностям полинуклеотидов, содержащих участки последовательностей, которые характеризуются существенной идентичностью последовательности и которые можно подвергать гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с применением данного подхода полноразмерные кодирующие последовательности, мотивы последовательности, кодирующие домен, представляющий интерес, или любой фрагмент нуклеотидной последовательности согласно вариантам осуществления можно перетасовать между нуклеотидными последовательностями согласно вариантам осуществления и соответствующими частями других известных нуклеотидных последовательностей *Cry* с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным свойством, представляющим интерес.

Свойства, представляющие интерес, включают без ограничения пестицидную активность на единицу пестицидного белка, стабильность белка и токсичность в отношении нецелевых видов, в частности людей, домашнего скота, а также растений и микроорганизмов, которые экспрессируют пестицидные полипептиды согласно вариантам осуществления. Варианты осуществления не связаны конкретной стратегией шаффлинга, при условии, что по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность согласно вариантам осуществления или ее часть задействованы в такую стратегию шаффлинга. В шаффлинге могут быть задействованы только нуклеотидные последовательности, раскрытые в данном документе, или он может дополнительно предусматривать шаффлинг других нуклеотидных последовательностей, известных из уровня техники. Стратегии

ДНК-шаффлинга известны из уровня техники. См., например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США № 5605793 и № 5837458.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления также можно применять для выделения соответствующих последовательностей из других организмов, в частности из других бактерий и более конкретно из других штаммов *Bacillus*. Таким образом, такие способы, как ПЦР, гибридизация и т. п., можно применять для идентификации таких последовательностей на основе гомологии их последовательности с последовательностями, изложенными в данном документе. Варианты осуществления охватывают последовательности, выбранные на основе идентичности их последовательности с полными последовательностями, изложенными в данном документе, или их фрагментами. Такие последовательности включают последовательности, которые являются ортологами раскрытых последовательностей. Термин "ортологи" относится к генам, происходящим от общего предкового гена и выявляемым у различных видов вследствие видообразования. Гены, обнаруживаемые у различных видов, считаются ортологами, если их нуклеотидные последовательности и/или кодируемые ими белковые последовательности характеризуются существенной идентичностью, как определено в других местах в данном документе. Функции ортологов зачастую являются высококонсервативными среди видов.

В случае подхода, основанного на ПЦР, олигонуклеотидные праймеры можно сконструировать для применения в ПЦР-реакциях для амплификации соответствующих последовательностей ДНК исходя из кДНК или геномной ДНК, извлеченных из любого организма, представляющего интерес. Способы конструирования праймеров для ПЦР и клонирования продуктов ПЦР общеизвестны из уровня техники и раскрыты в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), далее в данном документе "Sambrook". См. также Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); и Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Известные способы ПЦР включают без ограничения способы с применением парных праймеров, гнездовых праймеров, одиночных специфических праймеров, вырожденных праймеров, ген-специфических праймеров, вектор-специфических праймеров, частично ошибочно спаренных праймеров и т. п.

В случае гибридизационных методик всю известную нуклеотидную последовательность или ее часть применяют в качестве зонда, который избирательно гибридизируется с другими соответствующими нуклеотидными последовательностями, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т. е. геномные библиотеки или библиотеки кДНК) из выбранного

организма. Гибридизационные зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды и могут быть помечены выявляемой группой, такой как ^{32}P , или любым другим выявляемым маркером. Таким образом, например, зонды для гибридизации можно получить посредством мечения синтетических олигонуклеотидов на основе последовательностей согласно вариантам осуществления. В целом способы получения зондов для гибридизации и конструирования библиотек кДНК и геномных библиотек известны из уровня техники и раскрыты в Sambrook.

Например, полную последовательность, раскрытую в данном документе, или одну или несколько ее частей можно применять в качестве зонда, способного специфично гибридизироваться с соответствующими последовательностями и матричными РНК. Для обеспечения специфической гибридизации в различных условиях такие зонды включают последовательности, которые являются уникальными по отношению к последовательностям согласно вариантам осуществления и обычно имеют длину по меньшей мере приблизительно 10 или 20 нуклеотидов. Такие зонды можно применять для амплификации соответствующих последовательностей Сгу из выбранного организма посредством ПЦР. Данную методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического анализа для определения присутствия кодирующих последовательностей в организме. Гибридизационные методики включают гибридизационный скрининг высевных на чашку Петри библиотек ДНК (бляшек либо колоний; см., например, Sambrook).

Гибридизацию таких последовательностей можно осуществлять в жестких условиях. Термины "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации", как используется в данном документе, относятся к условиям, при которых зонд будет гибридизоваться со своей целевой последовательностью в явно большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза, в 5 раз или в 10 раз больше по сравнению с исходной последовательностью). Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться при различных обстоятельствах. Посредством контроля жесткости условий гибридизации и/или отмывки можно идентифицировать целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). В качестве альтернативы условия жесткости можно скорректировать для обеспечения некоторого ошибочного спаривания в последовательностях с тем, чтобы выявлять более низкие степени сходства (гетерологичное зондирование). Обычно длина зонда составляет менее приблизительно 1000 или 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия будут такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, как правило, концентрация ионов Na (или других солей) составляет приблизительно 0,01-1,0 М при pH 7,0-8,3, и температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например,

более 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты с помощью добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. Иллюстративные условия низкой жесткости включают гибридизацию в буферном растворе с 30-35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия) при 37°C и отмывку в 1X - 2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М тринатрия цитрата) при 50-55°C. Иллюстративные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C и отмывку в 0,5X - 1X SSC при 55-60°C. Иллюстративные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1 М NaCl, 1% SDS при 37°C и окончательную отмывку в 0,1X SSC при 60-65°C в течение по меньшей мере приблизительно 20 минут. Необязательно, отмывочные буферы могут содержать от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% SDS. В целом длительность гибридизации составляет менее приблизительно 24 часов, обычно от приблизительно 4 до приблизительно 12 часов.

Следующие термины применяют для описания родства последовательностей двух или нескольких нуклеиновых кислот или полинуклеотидов: (a) "эталонная последовательность", (b) "окно сравнения", (c) "идентичность последовательностей", (d) "процентная идентичность последовательностей" и (e) "существенная идентичность".

(a) Как используется в данном документе, "эталонная последовательность" представляет собой заданную последовательность, применяемую в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может представлять собой сокращенную или полную форму определенной последовательности; например, в виде сегмента полноразмерной кДНК или геной последовательности или полной кДНК или геной последовательности.

(b) Как используется в данном документе, "окно сравнения" относится к непрерывному и точно определенному сегменту в последовательности полинуклеотида, причем последовательность полинуклеотида в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Обычно длина окна сравнения составляет по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов и необязательно может составлять 30, 40, 50, 100 или больше. Специалисты в данной области понимают, что во избежание высокого сходства с эталонной последовательностью, вследствие включения гэпов в последовательность полинуклеотида, как правило, вводится штраф за внесение гэпа, и его вычитают из числа совпадений.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны из уровня техники. Таким образом, определение процентной идентичности последовательностей между любыми двумя последовательностями можно выполнить с применением математического алгоритма. Неограничивающими примерами таких математических алгоритмов являются алгоритм Myers и Miller (1988) CABIOS 4:11-17; алгоритм локального выравнивания Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; алгоритм

глобального выравнивания Needleman и Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; способ поиска для локального выравнивания Pearson и Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; the алгоритм of Karlin и Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, модифицированный по Karlin и Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

Для сравнения последовательностей с целью определения идентичности последовательностей можно применять компьютерные реализации данных математических алгоритмов. Такие реализации включают без ограничений CLUSTAL в программе PC/Gene (доступна от Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния); программу ALIGN (версия 2.0) и GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, версия 10 (доступны от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, Сан-Диего, Калифорния, США). Выравнивания с применением данных программ можно выполнять с применением параметров по умолчанию. Программа CLUSTAL хорошо описана в Higgins et al. (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins et al. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang et al. (1992) *CABIOS* 8:155-65; и Pearson et al. (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. Программа ALIGN основана на алгоритме согласно Myers and Miller (1988), упоминаемого выше. При сравнении аминокислотных последовательностей в программе ALIGN можно применять таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа - 12 и штраф за открытие гэпа - 4. Программы BLAST из Altschul, et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403, основаны на алгоритме согласно Karlin and Altschul, (1990), упоминаемого выше. Поиски нуклеотидных последовательностей в BLAST можно выполнять с помощью программы BLASTN с такими параметрами, как вес выравнивания=100, длина слова=12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеотидной последовательности, кодирующей белок согласно вариантам осуществления. Поиски белковых последовательностей в BLAST можно выполнять с помощью программы BLASTX при таких параметрах, как вес выравнивания=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белку или полипептиду согласно вариантам осуществления. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST (в BLAST 2.0), как описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. В качестве альтернативы, можно применять PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для выполнения итерированного поиска, посредством которого обнаруживают отдаленные взаимосвязи между молекулами. См. Altschul et al. (1997) выше. При применении BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTN для нуклеотидных последовательностей, BLASTX для белков). См. веб-сайт Национальной центра биотехнологической информации в сети Интернет по адресу ncbi.nlm.nih.gov. Выравнивание также можно выполнять вручную посредством просмотра.

(с) Как используется в данном документе, "идентичность последовательности" или "идентичность" в контексте двух последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептидных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях,

которые являются одинаковыми при выравнивании с нахождением максимального соответствия в указанном окне сравнения. Если процентную идентичность последовательности применяют в отношении белков, то подразумевается, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, где аминокислотные остатки заменены другими аминокислотными остатками с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью) и, следовательно, не изменяют функциональные свойства молекулы. Если последовательности отличаются консервативными заменами, то процентную идентичность последовательностей можно скорректировать в сторону повышения с тем, чтобы внести поправку на консервативную природу замены. Считается, что последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, характеризуются "сходством последовательности" или "сходством". Средства для осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. Как правило, она предусматривает оценку в баллах консервативной замены как частичного, а не полного несовпадения, что, таким образом, увеличивает процентную идентичность последовательностей. Таким образом, например, если идентичной аминокислоте присваивается балл 1, а неконсервативной замене присваивается балл ноль, то консервативной замене присваивается балл от нуля до 1. Оценку консервативных замен в баллах рассчитывают, например, как реализовано в программе PC/GENE (Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния).

(d) Как используется в данном документе, "процентная идентичность последовательностей" означает значение, определяемое посредством сравнения двух последовательностей, подвергнутых оптимальному выравниванию в пределах окна сравнения, где часть последовательности полинуклеотида в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают посредством определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности.

(e)(i) Термин "существенная идентичность" последовательностей полинуклеотидов означает, что полинуклеотид содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% или большей идентичностью последовательности при сравнении с эталонной последовательностью с применением одной из описанных программ для выравнивания с применением стандартных параметров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что данные значения можно соответствующим образом скорректировать для определения соответствующей идентичности белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями с учетом вырожденности

кодона, аминокислотного сходства, расположения рамки считывания и т. п. Существенная идентичность аминокислотных последовательностей для данных целей обычно означает, что идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% или больше.

Другим показателем того, что нуклеотидные последовательности являются существенно идентичными, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях. Обычно жесткие условия выбирают так, чтобы температура была приблизительно на 5°C ниже T_m конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. Тем не менее, жесткие условия охватывают значения температуры в диапазоне от приблизительно 1°C до приблизительно 20°C ниже T_m в зависимости от требуемой степени жесткости, что в ином случае оговорено в данном документе. Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизируются друг с другом в жестких условиях, все еще являются существенно идентичными, если полипептиды, которые они кодируют, являются существенно идентичными. Это может происходить, например, если копия нуклеиновой кислоты создана с применением максимальной вырожденности кодона, допускаемой генетическим кодом. Одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты существенно идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, вступает в иммунологическую перекрестную реакцию с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой.

(e)(ii) Термин "существенная идентичность" в контексте пептида указывает на то, что пептид содержит последовательность с по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью в пределах определенного окна сравнения. Оптимальное выравнивание для данных целей можно провести с применением алгоритма глобального выравнивания согласно Needleman and Wunsch (1970), упоминаемого выше. Показателем того, что две пептидные последовательности являются существенно идентичными, является то, что один пептид вступает в иммунологическую реакцию с антителами ко второму пептиду. Таким образом, пептид является существенно идентичным второму пептиду, например, когда два пептида отличаются лишь консервативной заменой. Пептиды, которые являются "существенно сходными", имеют общие последовательности, как отмечалось выше, за исключением того, что положения остатков, которые не являются идентичными, могут отличаться консервативными аминокислотными изменениями.

Использование термина "нуклеотидные конструкции" в данном документе не предназначено для ограничения вариантов осуществления нуклеотидными конструкциями, содержащими ДНК. Специалистам в данной области техники будет понятно, что нуклеотидные конструкции, в частности полинуклеотиды и олигонуклеотиды, состоящие из рибонуклеотидов и комбинаций рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, также можно использовать в способах, раскрытых в данном документе. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления дополнительно охватывают все

комплементарные формы таких конструкций, молекул и последовательностей. Дополнительно, нуклеотидные конструкции, нуклеотидные молекулы и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления охватывают все нуклеотидные конструкции, молекулы и последовательности, которые можно использовать в способах согласно вариантам осуществления для трансформации растений, в том числе без ограничения те, которые содержат дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и их комбинации. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды включают как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления также охватывают все формы нуклеотидных конструкций, в том числе без ограничения одонитевые формы, двухнитевые формы, шпильки, структуры "стебель-и-петля" и т. п.

Дополнительный вариант осуществления относится к трансформированному организму, такому как организм, выбранный из группы, состоящей из клеток растений и насекомых, бактерий, дрожжей, бакуловируса, простейших, нематод и водорослей. Трансформированный организм содержит: молекулу ДНК согласно вариантам осуществления, кассету экспрессии, содержащую указанную молекулу ДНК, или вектор, содержащий указанную кассету экспрессии, которые могут быть стабильно встроенными в геном трансформированного организма.

В ДНК-конструкциях предусмотрены последовательности согласно вариантам осуществления для экспрессии в организме, представляющем интерес. Конструкции будут включать 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью согласно вариантам осуществления. Как используется в данном документе, термин "функционально связанные" относится к функциональной связи между промотором и второй последовательностью, где последовательность промотора инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. В целом функционально связанный означает, что связанные последовательности нуклеиновых кислот являются смежными, и в случае необходимости соединения двух участков, кодирующих белок, являются смежными и в одной и той же рамке считывания. Конструкция может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, подлежащий введению в организм путем котрансформации. В качестве альтернативы, дополнительный(дополнительные) ген(гены) можно предусматривать в нескольких ДНК-конструкциях.

В такой ДНК-конструкции предусмотрены несколько сайтов рестрикции для вставки последовательности токсина Cгу, транскрипция которой подлежит регуляции регуляторными участками. ДНК-конструкция может дополнительно содержать гены селективных маркеров.

В направлении транскрипции 5' - 3' ДНК-конструкция будет включать: участок инициации транскрипции и трансляции (т. е. промотор), последовательность ДНК согласно вариантам осуществления и участок терминации транскрипции и трансляции (т.

е. участок терминации), функционирующие в организме, служащем в качестве хозяина. Участок инициации транскрипции (т. е. промотор) может являться нативным, аналогичным, чужеродным или гетерологичным в отношении организма-хозяина и/или в отношении последовательности согласно вариантам осуществления. Кроме того, промотор может представлять собой природную последовательность или, в качестве альтернативы, синтетическую последовательность. Как используется в данном документе, термин "чужеродный" указывает на то, что промотор не обнаружен в нативном организме, в который вводят промотор. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" в отношении последовательности согласно вариантам осуществления, предполагается, что промотор не является нативным или встречающимся в природе промотором для функционально связанной последовательности согласно вариантам осуществления. Как используется в данном документе, химерный ген содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с участком инициации транскрипции, который является гетерологичным в отношении кодирующей последовательности. Если промотор представляет собой нативную или природную последовательность, то экспрессия функционально связанной последовательности является измененной по сравнению с экспрессией дикого типа, что приводит к изменению фенотипа.

Участок терминации может являться нативным в отношении участка инициации транскрипции, может являться нативным в отношении функционально связанной последовательности ДНК, представляющей интерес, может являться нативным в отношении растения-хозяина или может быть получен из другого источника (т. е. являться чужеродным или гетерологичным в отношении промотора, последовательности, представляющей интерес, растения-хозяина или любой их комбинации).

Подходящие участки терминации доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как участки терминации генов 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; и Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

При необходимости нуклеиновую кислоту можно оптимизировать для повышения экспрессии в организме-хозяине. Таким образом, если организм-хозяин представляет собой растение, то для улучшенной экспрессии можно синтезировать синтетические нуклеиновые кислоты с применением предпочтительных для растения кодонов. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 для обзора применения предпочтительных для хозяина кодонов. Например, хотя последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления могут экспрессироваться у видов как однодольных, так и двудольных растений, последовательности можно модифицировать с учетом специфических предпочтений кодонов и предпочтений по содержанию GC у однодольных или двудольных, если было показано, что предпочтения

отличаются (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Таким образом, предпочтительный для маиса кодон для конкретной аминокислоты можно получить из известных генных последовательностей маиса. Данные о применении кодонов маиса для 28 генов из растений маиса приведены в таблице 4 из Murray, et al., упоминаемого выше. Из уровня техники доступны способы синтеза генов, предпочтительных для растений.

Известны дополнительные модификации последовательности для усиления экспрессии гена в клетке-хозяине. Они включают устранение последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналы сплайсинга в сайте на границе экзон-интрон, транспозон-подобные повторы, и других хорошо изученных последовательностей, которые могут являться неблагоприятными для экспрессии гена. Содержание GC в последовательности можно скорректировать до уровней, средних для конкретной клетки-хозяина, рассчитанных с учетом известных генов, экспрессируемых в клетке-хозяине. Как используется в данном документе, термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая содержит вектор и которая поддерживает репликацию и/или экспрессию предполагаемого вектора экспрессии. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки, такие как *E. coli*, или эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, насекомых, амфибий или млекопитающих, или клетки однодольных или двудольных растений. Примером клетки-хозяина, относящейся к однодольному растению, является клетка-хозяин маиса. По возможности последовательность модифицируют, чтобы избежать образования предсказанных шпильчатых вторичных структур мРНК.

Кассеты экспрессии могут дополнительно содержать 5'-лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут способствовать усилению трансляции. Трансляционные лидерные последовательности известны из уровня техники и включают: лидерные последовательности пикорнавирусов, например, лидерную последовательность EMCV (5'-некодирующий участок вируса энцефаломиокардита) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); лидерные последовательности потивирусов, например, лидерную последовательность TEV (вируса гравировки табака) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233-238), лидерную последовательность MDMV (вируса карликовой мозаики кукурузы), белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина человека (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94); нетранслируемую лидерную последовательность из mRNA белка оболочки вируса мозаики люцерны (PHK 4 AMV) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622-625); лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); и лидерную последовательность вируса хлоротической пятнистости маиса (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). См. также Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968.

При получении кассеты экспрессии с различными фрагментами ДНК можно проводить манипуляции так, чтобы получить последовательности ДНК в надлежащей ориентации и, при необходимости, в надлежащей рамке считывания. С данной целью для соединения фрагментов ДНК можно использовать адаптеры или линкеры, или можно

задействовать другие манипуляции для обеспечения подходящих сайтов рестрикции, удаления избыточной ДНК, удаления сайтов рестрикции и т. п. С данной целью можно задействовать мутагенез *in vitro*, репарацию с помощью праймеров, рестрикцию, гибридизацию, повторные замены, например, транзиции и трансверсии.

При практическом осуществлении вариантов осуществления можно применять ряд промоторов. Промоторы можно выбирать исходя из требуемого результата. Нуклеиновые кислоты можно объединять с конститутивными, предпочтительными для тканей, индуцируемыми или другими промоторами для экспрессии в организме-хозяине. Подходящие конститутивные промоторы для применения в растительной клетке-хозяине включают, например, коровий промотор промотора Rsyn7 и другие конститутивные промоторы, раскрытые в WO 99/43838 и патенте США № 6072050; коровий промотор 35S CaMV (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); промотор гена актина риса (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); убиквитиновый промотор (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 и Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); промотор гена MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); промотор гена ALS (патент США № 5659026) и т. п. Другие конститутивные промоторы включают, например, промоторы, рассматриваемые в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611.

В зависимости от требуемого результата целесообразной может быть экспрессия гена посредством индуцируемого промотора. Особый интерес для регуляции экспрессии нуклеотидных последовательностей согласно вариантам осуществления у растений представляют собой индуцируемые ранением промоторы. Такие индуцируемые ранением промоторы могут реагировать на повреждение, вызванное поеданием насекомым, и они включают промотор гена ингибитора протеиназы (pin II) картофеля (Ryan, (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); промоторы генов *wun1* и *wun2*, патент США № 5428148; промоторы генов *win1* и *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); промотор гена системина (McGurl et al. (1992) *Science* 225: 1570-1573); промотор гена WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); промотор гена MPI (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2): 141-150) и т. п., включенные в данный документ посредством ссылки.

Кроме того, в способах и нуклеотидных конструкциях согласно вариантам осуществления можно использовать индуцируемые патогеном промоторы. Такие индуцируемые патогеном промоторы включают промоторы из генов белков, связанных с патогенезом (PR-белков), которые индуцируются после инфицирования патогеном; например, PR-белков, SAR-белков, бета-1,3-глюканазы, хитиназы и т. д. См., например, Redolfi, et al., (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4: 645-656; и Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4: 111-116. См. также WO 99/43819, включенную в данный документ посредством ссылки.

Представляющими интерес являются промоторы, которые экспрессируются

локально в месте заражения патогеном или рядом с ним. См., например, Marineau, et al., (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton, et al., (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch, et al., (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; и Yang, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. См. также, Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; патент США № 5750386 (индуцируемые нематодами); а также литературные источники, цитируемые в этих документах. Представляющим особый интерес является индуцируемый промотор для гена PRms маиса, экспрессия которого индуцируется патогеном *Fusarium moniliforme* (см, например, Cordero, et al., (1992) *Physiol. Mol. Plant Path.* 41:189-200).

Регулируемые химическими веществами промоторы можно применять для модуляции экспрессии гена в растении посредством применения экзогенного химического регулятора. В зависимости от цели, промотор может представлять собой индуцируемый химическим веществом промотор, при этом применение химического вещества индуцирует экспрессию гена, или репрессируемый химическим веществом промотор, при этом применение химического вещества подавляет экспрессию гена. Индуцируемые химическими веществами промоторы известны из уровня техники и включают без ограничения промотор гена In2-2 маиса, который активируется антидотами к бензолсульфонамидным гербицидам, промотор гена GST маиса, который активируется гидрофобными электрофильными соединениями, которые применяются в качестве предвсходовых гербицидов, и промотор гена PR-1a табака, который активируется салициловой кислотой. Другие регулируемые химическими веществами промоторы, представляющие интерес, включают чувствительные к стероидам промоторы (см., например, индуцируемый глюкокортикоидом промотор в Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 и McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257), а также индуцируемые тетрациклинами и репрессируемые тетрациклинами промоторы (см., например, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, и патенты США №№ 5814618 и 5789156), включенные в данный документ посредством ссылки.

Предпочтительные для тканей промоторы можно использовать для целенаправленного усиления экспрессии пестицидного белка в конкретной ткани растения. Промоторы, предпочтительные для определенной ткани, включают промоторы, обсуждаемые в Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590 и Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. В случае необходимости, такие промоторы можно

модифицировать с получением слабой экспрессии.

Предпочтительные для листа промоторы известны из уровня техники. См., например, Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3:509-18; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6):1129-1138; и Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590.

Известны предпочтительные для корня промоторы или специфичные в отношении корня промоторы, и их можно выбирать из многих доступных из литературы или выделенных *de novo* из различных совместимых видов. См., например, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (специфичный в отношении корня сои ген глутаминсинтетазы); Keller and Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3(10):1051-1061 (специфичный в отношении корня регуляторный элемент в гене GRP 1.8 фасоли); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (специфичный в отношении корня промотор гена маннопинсинтазы (MAS) из *Agrobacterium tumefaciens*); and Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (полноразмерный кДНК-клон, кодирующий цитозольную глутаминсинтетазу (GS), которая экспрессируется в корнях и корневых клубеньках сои). См. также Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2(7):633-641, где описаны два корнеспецифических промотора, выделенных из генов гемоглобина азотфиксирующего растения, не относящегося к бобовым, *Parasponia andersonii* и родственного не фиксирующего азот растения, не относящегося к бобовым, *Trema tomentosa*. Промоторы данных генов были связаны с репортерным геном β -глюкуронидазы и введены как в *Nicotiana tabacum*, не относящееся к бобовым, так и в бобовое растение *Lotus corniculatus*, и в обоих случаях активность специфичного в отношении корня промотора сохранялась. Leach и Aoyagi (1991) описывают анализ промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии генов *rolC* и *rolD* *Agrobacterium rhizogenes*, индуцирующих разрастание корней (см. *Plant Science (Limerick)* 79(1):69-76). Они пришли к выводу, что в данных промоторах энхансер и предпочтительные для тканей ДНК-детерминанты разделены. Teeri et al. (1989) применяли слияние гена с *lacZ* для того, чтобы показать, что ген из Т-ДНК *Agrobacterium*, кодирующий октопинсинтазу, является особенно активным в эпидермисе кончика корня, и что ген TR2' является корнеспецифическим в интактном растении и стимулируется при ранении в ткани листа, что является особенно желательной комбинацией характеристик для применения с инсектицидным или ларвицидным геном (см. *EMBO J.* 8(2):343-350). Ген TR1', слитый с *nptII* (неомицинфосфотрансфераза II), продемонстрировал аналогичные характеристики. Дополнительные предпочтительные для корня промоторы включают промотор гена *VfENOD-GRP3* (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29(4):759-772) и промотор *rolB* (Capana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25(4):681-691). См. также патенты США №№ 5837876; 5750386; 5633363; 5459252; 5401836; 5110732 и 5023179.

"Предпочтительные для семени" промоторы включают как "специфичные в отношении семени" промоторы (данные промоторы активны в ходе развития семени,

такие как промоторы генов запасных белков семени), так и промоторы "прорастания семени" (данные промоторы активны в ходе прорастания семени). См. Thompson et al. (1989) BioEssays 10:108, включенную в данный документ посредством ссылки. Такие предпочтительные для семени промоторы включают без ограничения промоторы генов *Cim1* (индуцируемый цитокинином транскрипт); *cZ19B1* (19-кДа зеин маиса) и *milps* (мио-инозитол-1-фосфатсинтаза); (см. патент США № 6225529, включенный в данный документ посредством ссылки). Промоторы генов гамма-зеина и *Glob-1* представляют собой специфичные в отношении эндосперма промоторы. У двудольных растений специфичные в отношении семени промоторы включают без ограничения промоторы генов β -фазеолина фасоли, напина, β -конглицинина, лектина сои, круциферина и т. п. У однодольных растений специфичные в отношении семени промоторы включают без ограничения промоторы генов 15-кДа зеина, 22-кДа зеина, 27-кДа зеина, g-зеина, *waxy*, *shrunk1*, *shrunk2*, глобулина 1 маиса и т. д. См. также WO 00/12733, включенный в данный документ посредством ссылки, где раскрыты предпочтительные для семени промоторы из генов *end1* и *end2*. Промотор, который характеризуется "предпочтительной" экспрессией в конкретной ткани, экспрессируется в такой ткани в большей степени, чем по меньшей мере в одной другой растительной ткани. Некоторые предпочтительные для ткани промоторы демонстрируют практически исключительную экспрессию в конкретной ткани.

Если требуется низкий уровень экспрессии, то будут применять слабые промоторы. В целом, как используется в данном документе, термин "слабый промотор" относится к промотору, который управляет экспрессией кодирующей последовательности на низком уровне. Под низким уровнем экспрессии подразумевают уровни от приблизительно 1/1000 транскриптов до приблизительно 1/100000 транскриптов, до приблизительно 1/500000 транскриптов. В качестве альтернативы, подразумевается, что термин "слабые промоторы" также охватывает промоторы, которые управляют экспрессией только в небольшом количестве клеток и не управляют в других, при этом обеспечивается общий низкий уровень экспрессии. Если промотор управляет экспрессией с неприемлемо высокими уровнями, то части последовательности промотора можно удалить или модифицировать для снижения уровней экспрессии.

Такие слабые конститутивные промоторы включают, например, коровый промотор промотора *Rsyn7* (WO 99/43838 и патент США № 6072050), коровый промотор 35S *CaMV* и т. п. Другие конститутивные промоторы включают, например, промоторы, раскрытые в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611, включенных в данный документ посредством ссылки.

Как правило, кассета экспрессии будет содержать ген селективного маркера для отбора трансформированных клеток. Гены селективных маркеров используют для отбора трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, такие как гены, кодирующие неомизинфосфотрансферазу II (NEO) и гигромицинфосфотрансферазу (HPT), а также гены, обеспечивающие

устойчивость к гербицидным соединениям, таким как глюфосинат аммония, бромоксинил, имидазолиноны и 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). Дополнительные примеры подходящих селективируемых маркерных генов включают без ограничения гены, отвечающие за устойчивость к хлорамфениколу (Herrera Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-213; и Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); стрептомицину (Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); спектиномицину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); блеомицину (Hille et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); сульфонамиду (Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); бромоксинилу (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423); глифосату (Shaw et al. (1986) *Science* 233:478-481; и патенты США №№ 7709702; и 7462481); фосфинотрицину (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518). См. в общих чертах Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3: 506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71: 63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2419-2422; Barkley et al. (1980) в *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48: 555-566; Brown et al. (1987) *Cell* 49: 603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52: 713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2549-2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248: 480-483; Gossen (1993) диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Гейдельбергский университет; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3343-3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3952-3956; Baim et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072-5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10: 143-162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Гейдельбергский университет; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 913-919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); и Gill et al. (1988) *Nature* 334: 721-724. Такие раскрытия включены в данный документ посредством ссылки.

Приведенный выше перечень генов селективных маркеров не предназначен для ограничения. Любой ген селективного маркера можно применять в вариантах осуществления.

Способы согласно вариантам осуществления включают введение полипептида или полинуклеотида в растение. Подразумевается, что "введение" означает включение в растение полинуклеотида или полипептида таким образом, что последовательность попадает внутрь клетки растения. Способы согласно вариантам осуществления не зависят от конкретного способа введения полинуклеотида или полипептида в растение, при условии, что полинуклеотид или полипептиды попадают внутрь по меньшей мере одной клетки растения. Из уровня техники известны способы введения полинуклеотида или полипептидов в растения, в том числе без ограничений способы стабильной

трансформации, способы временной трансформации и способы трансформации, опосредованной вирусами.

Подразумевается, что "стабильная трансформация" означает, что нуклеотидная конструкция, вводимая в растение, интегрируется в геном растения и может быть унаследована его потомством. Подразумевается, что "временная трансформация" означает, что полинуклеотид вводится в растение и не интегрируется в геном растения, или в растение вводится полипептид.

Протоколы трансформации, а также протоколы введения нуклеотидных последовательностей в растения могут меняться в зависимости от типа растения или клетки растения, т. е. однодольных или двудольных, которые являются мишенями для трансформации. Подходящие способы введения нуклеотидных последовательностей в клетки растений и последующей вставки в геном растения включают микроинъекцию (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), электропорацию (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606), опосредованную *Agrobacterium* трансформацию (патенты США №№ 5563055 и 5981840), прямой перенос генов (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722), и баллистическое ускорение частиц (см., например, патенты США №№ 4945050; 5879918; 5886244; и 5932782; Tomes et al. (1995) in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); и McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); а также трансформацию посредством *Lecl* (WO 00/28058). Что касается трансформации картофеля, см. Tu et al. (1998) *Plant Molecular Biology* 37: 829-838 и Chong et al. (2000) *Transgenic Research* 9: 71-78. Дополнительные процедуры трансформации можно найти в Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (лук); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (соя); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (соя); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (соя); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (рис); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (маис); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (маис); патенты США №№ 5240855; 5322783 и 5324646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (маис); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (маис); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; патент США №№ 5736369 (злаки); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) в *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пыльца); Каепплер et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 и Каепплер et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (опосредованная нитевидными кристаллами трансформация); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (электропорация); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255; и Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (маис, с помощью *Agrobacterium tumefaciens*); все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления последовательности согласно вариантам

осуществления можно обеспечивать в растении с применением ряда способов временной трансформации. Такие способы временной трансформации включают без ограничения введение белка, являющегося токсином Cry, или его вариантов и фрагментов непосредственно в растение или введение транскрипта токсина Cry в растение. Такие способы включают, например, микроинъекцию или бомбардировку частицами. См., например, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202: 179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44: 53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180; и Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107: 775-784, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы, растение можно подвергать временной трансформации с помощью полинуклеотида токсина Cry с применением методик, известных из уровня техники. Такие методики включают применение вирусной векторной системы и осаждение полинуклеотида таким способом, который исключает последующее высвобождение ДНК. Таким образом, транскрипция связанной с частицами ДНК может иметь место, однако частота, с которой она высвобождается для интеграции в геном, в значительной степени снижена. Такие способы включают применение частиц, покрытых полиэтиленмином (PEI; № по кат. Sigma P3143).

Из уровня техники известны способы нацеленной вставки полинуклеотида в конкретное местоположение в геноме растения. В одном варианте осуществления вставку полинуклеотида в требуемое местоположение в геноме выполняют с применением системы сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 и WO99/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Вкратце, полинуклеотид согласно вариантам осуществления может содержаться в кассете для переноса, фланкированной двумя неидентичными сайтами рекомбинации. Кассету для переноса вводят в растение, имеющее в своем геноме стабильно встроенный целевой сайт, фланкированный двумя неидентичными сайтами рекомбинации, которые соответствуют сайтам кассеты для переноса. Обеспечивают подходящую рекомбиназу, и кассета для переноса интегрируется в целевой сайт. Полинуклеотид, представляющий интерес, таким образом интегрируется в конкретное хромосомное положение в геноме растения.

Из клеток, которые были трансформированы, можно вырастить растения в соответствии с традиционными способами. См., например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Затем данные растения можно выращивать и опылять либо с помощью такой же трансформированной линии, либо отличных линий, и идентифицировать полученный гибрид, характеризующийся конститутивной или индуцируемой экспрессией требуемой фенотипической характеристики. Можно вырастить два или более поколений для того, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемой фенотипической характеристики стабильно поддерживается и наследуется, а затем собрать семена, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемой фенотипической характеристики была достигнута.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно

обеспечить в растении путем приведения растения в контакт с вирусом или нуклеиновыми кислотами вируса. В целом такие способы включают встраивание нуклеотидной конструкции, представляющей интерес, в молекулу ДНК или РНК вируса. Понятно, что рекомбинантные белки согласно вариантам осуществления могут первоначально синтезироваться как часть вирусного полипротеина, который позже может процессироваться посредством протеолиза *in vivo* или *in vitro* с образованием необходимого пестицидного белка. Также понятно, что такой вирусный полипротеин, содержащий по меньшей мере часть аминокислотной последовательности пестицидного белка согласно вариантам осуществления, может обладать требуемой пестицидной активностью. Такие вирусные полипротеины и нуклеотидные последовательности, которые их кодируют, охватываются вариантами осуществления. Способы получения растений с нуклеотидными конструкциями и обеспечения выработки кодируемых белков в растениях, которые включают молекулы ДНК или РНК вирусов, известны из уровня техники. См., например, патенты США №№ 5889191; 5889190; 5866785; 5589367 и 5316931; включенные в данный документ посредством ссылки.

Варианты осуществления дополнительно относятся к материалу для размножения трансформированного растения согласно вариантам осуществления, в том числе без ограничения к семенам, клубням, клубнелуковицам, луковицам, листьям и черенкам корней и побегов.

Варианты осуществления можно применять для трансформации любых видов растений, в том числе без ограничения однодольных и двудольных. Примеры растений, представляющих интерес, включают без ограничений кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности виды *Brassica*, применимые в качестве источников растительного масла, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, просо африканское (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), разновидности арахиса (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофейное дерево (*Coffea* spp.), кокосовую пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), шоколадное дерево (*Theobroma cacao*), чайный куст (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), разновидности сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), разновидности овса, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные растения.

Овощи включают разновидности томата (*Lycopersicon esculentum*), латук

(например, *Lactuca sativa*), разновидности зеленой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), разновидности лимской фасоли (*Phaseolus limensis*), разновидности гороха (*Lathyrus* spp.) и представителей рода *Cucumis*, таких как огурец (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) и дыня мускусная (*C. melo*). Декоративные растения включают азалию (*Rhododendron* spp.), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (*Rosa* spp.), тюльпаны (*Tulipa* spp.), нарциссы (*Narcissus* spp.), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансеттию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные, которые можно использовать при осуществлении на практике вариантов осуществления, включают, например, виды сосны, такие как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна желтая (*Pinus ponderosa*), скрученная широкохвойная сосна (*Pinus contorta*) и сосна лучистая (*Pinus radiata*); лжетсугу тиссолистную (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу западную (*Tsuga canadensis*); ель ситхинскую (*Picea glauca*); секвойю вечнозеленую (*Sequoia sempervirens*); виды истинной пихты, такие как пихта белая (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); и виды туи, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и кипарисовик нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения согласно вариантам осуществления включают культурные растения, в том числе без ограничения кукурузу, люцерну, подсолнечник, *Brassica* spp., сою, хлопчатник, сафлор, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак, сахарный тростник и т. д.

Разновидности газонной травы включают без ограничения мятлик однолетний (*Poa annua*); плевел многоцветковый (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяницу красную Чуинга (*Festuca rubra*); полевицу тонкую (*Agrostis tenuis*); полевицу болотную (*Agrostis palustris*); житняк пустынный (*Agropyron desertorum*); житняк гребенчатый (*Agropyron cristatum*); овсяницу длиннолистную (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежу сборную (*Dactylis glomerata*); плевел многолетний (*Lolium perenne*); овсяницу красную (*Festuca rubra*); полевицу белую (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяницу овечью (*Festuca ovina*); костер безостый (*Bromus inermis*); овсяницу тростниковую (*Festuca arundinacea*); тимopheевку луговую (*Phleum pratense*); полевицу собачью (*Agrostis canina*); бескильницу расставленную (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); свинорой пальчатый (*Cynodon* spp.); узкобороздник однобокий (*Stenotaphrum secundatum*); зойсию (*Zoysia* spp.); гречку заметную (*Paspalum notatum*); аксонопус афинский (*Axonopus affinis*); эремохлою змеехвостую (*Eremochloa ophiuroides*); кикуйю (*Pennisetum clandestinum*); паспалум влагалищный (*Paspalum vaginatum*); москитную траву (*Bouteloua gracilis*); бизонову траву (*Buchloe dactyloids*); боковой овес (*Bouteloua curtipendula*).

Растения, представляющие интерес, включают зерновые растения, которые дают семена, представляющие интерес, масличные растения и бобовые растения. Семена, представляющие интерес, включают семена зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и т. д. Масличные растения включают хлопчатник, сою, сафлор, подсолнечник, *Brassica*, маис, люцерну, пальму, кокосовую пальму, лен, клещевину, маслину и т. д. Бобовые растения включают разновидности бобов

и разновидности гороха. Бобы включают гуар, рожковое дерево, пажитник, сою, разновидности обыкновенной фасоли, вигну китайскую, золотистую фасоль, лимскую фасоль, стручковую фасоль, разновидности чечевицы, турецкий горох и т. д.

В определенных вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления можно пакетировать с любой комбинацией последовательностей полинуклеотидов, представляющих интерес, для создания растений с требуемым фенотипом. Например, полинуклеотиды согласно вариантам осуществления можно пакетировать с любыми другими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, в том числе без ограничения инсектицидные белки из *Pseudomonas* sp., как, например, PSEEN3174 (Monalysin, (2011) PLoS Pathogens, 7:1-13), из *Pseudomonas protegens* штамма CHA0 и *Pf-5* (*panee fluorescens*) (Pechy-Tarr, (2008) Environmental Microbiology 10:2368-2386: № доступа в GenBank EU400157); из *Pseudomonas Taiwanensis* (Liu, et al., (2010) J. Agric. Food Chem. 58:12343-12349) и из *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhang, et al., (2009) Annals of Microbiology 59:45-50 и Li, et al., (2007) Plant Cell Tiss. Organ Cult. 89:159-168); инсектицидные белки из *Photobacterium* sp. и *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) The Open Toxinology Journal 3:101-118 и Morgan, et al., (2001) Applied and Envir. Micro. 67:2062-2069, патент США № 6048838 и патент США № 6379946); полипептида PIP-1 из публикации заявки на патент США US20140007292; полипептидов AfIP-1A и/или AfIP-1B из публикации заявки на патент США US20140033361; полипептида PNI-4 из публикации заявки на патент США US20140274885 и US20160040184; полипептида PIP-47 из публикации согласно PCT № WO2015/023846, полипептида PIP-72 из публикации согласно PCT № WO2015/038734; полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65 из публикации согласно PCT № WO2015/120270; полипептида PtIP-83 из публикации согласно PCT № WO2015/120276; полипептида PtIP-96 из публикации согласно PCT с регистрационным № PCT/US15/55502; полипептида IPD079 из патентного документа США с регистрационным № 62/201977; полипептида IPD082 из патентного документа США с регистрационным № 62/269482; и δ -эндотоксинов, в том числе без ограничения генами δ -эндотоксинов классов Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry15, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry22, Cry23, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry 28, Cry 29, Cry 30, Cry31, Cry32, Cry33, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry38, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry45, Cry 46, Cry47, Cry49, Cry50, Cry51, Cry52, Cry53, Cry 54, Cry55, Cry56, Cry57, Cry58, Cry59, Cry60, Cry61, Cry62, Cry63, Cry64, Cry65, Cry66, Cry67, Cry68, Cry69, Cry70, Cry71, и Cry 72 и генами цитолитических токсинов Cyt1 и Cyt2 *B. thuringiensis*. Представители этих классов инсектицидных белков из *B. thuringiensis* хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на веб-сайте по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ к которому можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www").

Примеры δ -эндотоксинов также включают без ограничения белки Cry1A из

патентов США №№ 5880275 и 7858849; токсин DIG-3 или DIG-11 (варианты белков Cry с N-концевой делецией α -спирали 1 и/или α -спирали 2, такие как Cry1A) из патентов США №№ 8304604 и 8304605, Cry1B из заявки на патент США с регистрационным № 10/525318; Cry1C из патента США № 6033874; Cry1F из патентов США №№ 5188960, 6218188; химеры Cry1A/F из патентов США №№ 7070982; 6962705 и 6713063); белок Cry2, такой как белок Cry2Ab из патента США № 7064249); белок Cry3A, в том числе без ограничения разработанный гибридный инсектицидный белок (eHIP), созданный путем слияния уникальных комбинаций вариабельных участков и консервативных блоков по меньшей мере двух различных белков Cry (публикация заявки на патент США № 2010/0017914); белок Cry4; белок Cry5; белок Cry6; белки Cry8 из патентов США №№ 7329736, 7449552, 7803943, 7476781, 7105332, 7378499 и 7462760; белок Cry9, такой как представители семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F; белок Cry15 из Naimov, et al., (2008) *Applied and Environmental Microbiology* 74:7145-7151; белок Cry22, белок Cry34Ab1 из патентов США №№ 6127180, 6624145 и 6340593; белок CryET33 и CryET34 из патентов США № 6248535, 6326351, 6399330, 6949626, 7385107 и 7504229; гомологи CryET33 и CryET34 из публикации заявки на патент США № 2006/0191034, 2012/0278954 и РСТ публикации № WO 2012/139004; белок Cry35Ab1 из патентов США №№ 6083499, 6548291 и 6340593; белок Cry46, белок Cry 51, бинарный токсин Cry; TIC901 или родственный токсин; TIC807 из US 2008/0295207; ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127, TIC128 из РСТ US 2006/033867; AXMI-027, AXMI-036 и AXMI-038 из патента США № 8236757; AXMI-031, AXMI-039, AXMI-040, AXMI-049 из US7923602; AXMI-018, AXMI-020 и AXMI-021 из WO 2006/083891; AXMI-010 из WO 2005/038032; AXMI-003 из WO 2005/021585; AXMI-008 из US 2004/0250311; AXMI-006 из US 2004/0216186; AXMI-007 из US 2004/0210965; AXMI-009 из US 2004/0210964; AXMI-014 из US 2004/0197917; AXMI-004 из US 2004/0197916; AXMI-028 и AXMI-029 из WO 2006/119457; AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014 и AXMI-004 из WO 2004/074462; AXMI-150 из патента США № 8084416; AXMI-205 из US20110023184; AXMI-011, AXMI-012, AXMI-013, AXMI-015, AXMI-019, AXMI-044, AXMI-037, AXMI-043, AXMI-033, AXMI-034, AXMI-022, AXMI-023, AXMI-041, AXMI-063 и AXMI-064 из US 2011/0263488; AXMI-R1 и родственные белки из US 2010/0197592; AXMI221Z, AXMI222Z, AXMI223Z, AXMI224Z и AXMI225Z из WO 2011/103248; AXMI218, AXMI219, AXMI220, AXMI226, AXMI227, AXMI228, AXMI229, AXMI230 и AXMI231 из WO11/103247; AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 и AXMI-184 из патента США № 8334431; AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 и AXMI-045 из US 2010/0298211; AXMI-066 и AXMI-076 из US20090144852; AXMI128, AXMI130, AXMI131, AXMI133, AXMI140, AXMI141, AXMI142, AXMI143, AXMI144, AXMI146, AXMI148, AXMI149, AXMI152, AXMI153, AXMI154, AXMI155, AXMI156, AXMI157, AXMI158, AXMI162, AXMI165, AXMI166, AXMI167, AXMI168, AXMI169, AXMI170, AXMI171, AXMI172, AXMI173, AXMI174, AXMI175, AXMI176, AXMI177, AXMI178, AXMI179, AXMI180, AXMI181, AXMI182, AXMI185, AXMI186, AXMI187, AXMI188, AXMI189 из

патента США № 8318900; AXMI079, AXMI080, AXMI081, AXMI082, AXMI091, AXMI092, AXMI096, AXMI097, AXMI098, AXMI099, AXMI100, AXMI101, AXMI102, AXMI103, AXMI104, AXMI107, AXMI108, AXMI109, AXMI110, AXMI111, AXMI112, AXMI114, AXMI116, AXMI117, AXMI118, AXMI119, AXMI120, AXMI121, AXMI122, AXMI123, AXMI124, AXMI1257, AXMI1268, AXMI127, AXMI129, AXMI164, AXMI151, AXMI161, AXMI183, AXMI132, AXMI138, AXMI137 из US 2010/0005543; и белки Cry, такие как Cry1A и Cry3A, имеющие модифицированные протеолитические сайты, из патента США № 8319019; а также белок-токсин Cry1Ac, Cry2Aa и Cry1Ca из штамма VBTS 2528 *Bacillus thuringiensis* из публикации заявки на патент США № 2011/0064710. Другие белки Cry хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на сайте по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ к которому можно получить во всемирной сети Интернет с применением приставки "www"). Инсектицидная активность белков Cry хорошо известна специалисту в данной области техники (для обзора см. van Frannkenhuyzen, (2009) J. Invert. Path. 101:1-16). Применение белков Cry в качестве признаков трансгенного растения хорошо известно специалисту в данной области техники, и трансгенные растения с Cry, в том числе без ограничения с Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A, Cry9c и CBI-Bt были разрешены контролирующими органами (см., Sanahuja, (2011) Plant Biotech Journal 9:283-300 и CERA (2010), База данных ГМ растений центра по оценке риска для окружающей среды (CERA), Исследовательский фонд ILSI, г. Вашингтон, на сайте cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database, доступ к которым можно получить во всемирной сети Интернет с использованием приставки "www"). В растениях также может экспрессироваться два или более пестицидных белков, хорошо известных специалисту в данной области техники, таких как Vip3Ab и Cry1Fa (US2012/0317682), Cry1BE и Cry1F (US2012/0311746), Cry1CA и Cry1AB (US2012/0311745), Cry1F и CryCa (US2012/0317681), Cry1DA и Cry1BE (US2012/0331590), Cry1DA и Cry1Fa (US2012/0331589), Cry1AB и Cry1BE (US2012/0324606), а также Cry1Fa и Cry2Aa, Cry1I или Cry1E (US2012/0324605). Пестицидные белки включают также инсектицидные липазы, в том числе ацилгидролазы липидов из патента США № 7491869 и холестерин-оксидазы, как, например, из *Streptomyces* (Purcell et al. (1993) Biochem Biophys Res Commun 15:1406-1413). Пестицидные белки также включают токсины VIP (вегетативные инсектицидные белки) из патентов США №№ 5877012, 6107279, 6137033, 7244820, 7615686 и 8237020 и т. п. Другие белки VIP хорошо известны специалисту в данной области техники (см. веб-сайт по адресу lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с применением приставки "www"). Пестицидные белки также включают белки токсинового комплекса (ТС), которые можно получить из таких организмов, как *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* и *Paenibacillus* (см. патенты США №№ 7491698 и 8084418). Некоторые ТС-белки обладают "самостоятельной"

инсектицидной активностью, а другие ТС-белки повышают активность самостоятельных токсинов, вырабатываемых тем же конкретным организмом. Токсичность "самостоятельного" ТС-белка (например, из *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* или *Paenibacillus*) может повышаться с помощью одного или нескольких ТС-белков-"усилителей", полученных из организма-источника из другого рода. Существует три основных типа ТС-белков. Как изложено в данном документе, белки класса А ("белок А") представляют собой самостоятельные токсины. Белки класса В ("белок В") и белки класса С ("белок С") повышают токсичность белков класса А. Примерами белков класса А являются TcbA, TcdA, XptA1 и XptA2. Примерами белков класса В являются TcaC, TcdB, XptB1Xb и XptC1Wi. Примерами белков класса С являются TccC, XptC1Xb и XptB1Wi. Пестицидные белки также включают белки яда пауков, змей и скорпионов. Примеры пептидов яда пауков включают без ограничения пептиды ликотоксин-1 и его мутантные формы (патент США № 8334366). Полученные комбинации также могут включать несколько копий любого из полинуклеотидов, представляющих интерес. Полинуклеотиды согласно вариантам осуществления можно также пакетировать с любым другим геном или комбинацией генов для получения растений с разнообразными комбинациями необходимых признаков, в том числе без ограничений с признаками, необходимыми для питания животных, такими как гены, обуславливающие высокое содержание масла (например, патент США № 6232529); сбалансированное содержание аминокислот (например, хордотионины (патенты США №№ 5990389; 5885801; 5885802; и 5703049); ячмень с высоким содержанием лизина (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165: 99-106 и WO 98/20122) и белки с высоким содержанием метионина (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6279; Kirihaara et al. (1988) Gene 71: 359; и Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 123)); повышенная усвояемость (например, модифицированные запасные белки (патент США № 6858778) и гены тиоредоксинов (патент США № 7009087), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Полинуклеотиды согласно вариантам осуществления также можно пакетировать с признаками, необходимыми для обеспечения устойчивости к заболеваниям или гербицидам (например, генами детоксикации фумонизина (патент США № 5792931); генами авирулентности или устойчивости к заболеваниям (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262: 1432; и Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); мутантными формами ацетолактатсинтазы (ALS), которые приводят к устойчивости к гербицидам, такими как формы с мутациями S4 и/или Hra; ингибиторами глутаминсинтазы, такими как фосфинотрицин или basta (например, ген bar); и устойчивости к глифосату (ген EPSPS и ген GAT, которые раскрыты в патентах США №№ 7709702 и 7462481; и с признаками, требуемыми для обработки или переработки продуктов, такими как высокое содержание масла (например, патент США № 6232529); модифицированные масла (например, гены десатуразы жирных кислот (патент США № 5952544; WO 94/11516)); разновидности модифицированного крахмала (например, ADPG-пирофосфорилазы (AGPaза), крахмал-синтазы (SS), крахмал-ветвящие ферменты (SBE) и

крахмал-деветвящие ферменты (SDBE)); и полимеры или биопластмассы (например, патент США № 5602321; бета-кетотиолаза, полигидроксибутиратсинтаза и ацетоацетил-СоА-редуктаза (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 5837-5847) облегчают экспрессию полигидроксиалканоатов (PHA)), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Также можно комбинировать полинуклеотиды согласно вариантам осуществления с полинуклеотидами, обеспечивающими агрономические признаки, такие как мужская стерильность (например, см. патент США № 5583210), прочность стебля, время цветения, или признаки, связанные с технологией трансформации, такие как регуляция клеточного цикла или нацеливание на гены (например, WO 99/61619; WO 00/17364; WO 99/25821), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

В некотором варианте осуществления пакетированный признак может представлять собой признак или трансгенный объект, который получил разрешение контролирующих органов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, и их можно найти на сайте Центра по оценке риска для окружающей среды (sega-gmc.org/?action=gm_crop_database, доступ к которому можно получить с применением приставки www) и на сайте Международной службы по приобретению агробиотехнологических приложений (isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp, доступ к которому можно получить с применением приставки www).

Трансгенные растения могут содержать "пакет" из одного или нескольких инсектицидных полинуклеотидов, раскрытых в данном документе, с одним или несколькими дополнительными полинуклеотидами, вследствие чего обеспечивается продуцирование или супрессия нескольких последовательностей полипептидов. Трансгенные растения, содержащие "пакеты" из последовательностей полинуклеотидов, можно получить с помощью традиционных способов разведения или посредством способов генной инженерии либо с применением и того, и другого. Эти способы включают без ограничения разведение индивидуальных линий, каждая из которых содержит полинуклеотид, представляющий интерес, трансформацию трансгенного растения, содержащего ген, раскрытый в данном документе, дополнительным геном и котрансформацию генами одной растительной клетки. Используемый в данном документе термин "пакетированный" предусматривает состояние, при котором в одном и том же растении присутствуют несколько признаков (т. е. оба признака включены в ядерный геном, один признак включен в ядерный геном, и один признак включен в геном пластиды, или оба признака включены в геном пластиды). В одном неограничивающем примере "пакетированные признаки" предусматривают молекулярный "пакет", в котором последовательности физически прилегают друг к другу. "Признак", используемый в данном документе, относится к фенотипу, обусловленному конкретной последовательностью или группами последовательностей. Котрансформацию генов можно проводить с применением одиночных векторов для трансформации, содержащих несколько генов, или нескольких векторов, которые несут отдельные гены. Если

последовательности пакетированы посредством генетической трансформации растений, то последовательности полинуклеотидов, представляющие интерес, можно комбинировать в любое время и в любом порядке. Признаки можно вводить одновременно в рамках протокола котрансформации с полинуклеотидами, представляющими интерес, предусмотренными в любой комбинации кассет для трансформации. Например, если будут вводить две последовательности, то данные две последовательности могут содержаться в отдельных кассетах для трансформации (транс) или содержаться в одной и той же кассете для трансформации (цис). Экспрессией последовательностей может управлять один и тот же промотор или различные промоторы. В определенных случаях может потребоваться введение кассеты для трансформации, которая будет подавлять экспрессию полинуклеотида, представляющего интерес. Ее можно комбинировать с любой комбинацией других кассет супрессии или кассет сверхэкспрессии для получения требуемой комбинации признаков в растении. Кроме того, считается, что последовательности полинуклеотидов можно пакетировать в требуемом местоположении в геноме с применением системы сайт-специфической рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853. Трансгенные растения могут содержать "пакет" из одного или нескольких инсектицидных полинуклеотидов, раскрытых в данном документе, с одним или несколькими дополнительными полинуклеотидами, вследствие чего обеспечивается продуцирование нескольких последовательностей полипептидов. Трансгенные растения, содержащие "пакеты" из последовательностей полинуклеотидов, можно получить с помощью традиционных способов разведения или посредством способов генной инженерии либо с применением и того, и другого. Эти способы включают без ограничения разведение индивидуальных линий, каждая из которых содержит полинуклеотид, представляющий интерес, трансформацию трансгенного растения, содержащего ген, раскрытый в данном документе, дополнительным геном и котрансформацию генами одной растительной клетки. Используемый в данном документе термин "пакетированный" предусматривает состояние, при котором в одном и том же растении присутствуют несколько признаков (т. е. оба признака включены в ядерный геном, один признак включен в ядерный геном, и один признак включен в геном пластиды, или оба признака включены в геном пластиды). В одном неограничивающем примере "пакетированные признаки" предусматривают молекулярный "пакет", в котором последовательности физически прилегают друг к другу. "Признак", используемый в данном документе, относится к фенотипу, обусловленному конкретной последовательностью или группами последовательностей. Котрансформацию генов можно проводить с применением одиночных векторов для трансформации, содержащих несколько генов, или нескольких векторов, которые несут отдельные гены. Если последовательности пакетированы посредством генетической трансформации растений, то последовательности полинуклеотидов, представляющие интерес, можно комбинировать в любое время и в любом порядке. Признаки можно вводить

одновременно в рамках протокола котрансформации с полинуклеотидами, представляющими интерес, предусмотренными в любой комбинации кассет для трансформации. Например, если будут вводить две последовательности, то данные две последовательности могут содержаться в отдельных кассетах для трансформации (транс) или содержаться в одной и той же кассете для трансформации (цис). Экспрессией последовательностей может управлять один и тот же промотор или различные промоторы. В определенных случаях может потребоваться введение кассеты для трансформации, которая будет подавлять экспрессию полинуклеотида, представляющего интерес. Ее можно комбинировать с любой комбинацией других кассет супрессии или кассет сверхэкспрессии для получения требуемой комбинации признаков в растении. Кроме того, считается, что последовательности полинуклеотидов можно пакетировать в требуемом местоположении в геноме с применением системы сайт-специфической рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853.

Было доказано, что экспрессия δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* в трансгенных растениях кукурузы является эффективным средством контроля важных для сельского хозяйства насекомых-вредителей (Perlak, et al., 1990; 1993). Однако, возникли насекомые, которые устойчивы к δ -эндотоксинам *B. thuringiensis*, экспрессирующимся в трансгенных растениях. Такая устойчивость, если она станет широко распространенной, будет явно ограничивать коммерческое значение идиоплазмы, содержащей гены, кодирующие такие δ -эндотоксины *B. thuringiensis*.

Одним способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении целевых вредителей и одновременного снижения развития устойчивых к инсектицидам вредителей является применение полученных нетрансгенных (т. е. с неинсектицидным белком) рефугиев (раздел неинсектицидных сельскохозяйственных культур/кукурузы) для применения трансгенных сельскохозяйственных культур, вырабатывающих один инсектицидный белок, активный в отношении целевых вредителей. Управление по охране окружающей среды США (epa.gov/oprbpddl/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm, доступ к которому можно получить с помощью префикса www) публикует требования к применению вместе с трансгенными сельскохозяйственными культурами, продуцирующими один Bt-белок, активный в отношении вредителей-мишеней. Кроме того, Национальная ассоциация производителей кукурузы на своем веб-сайте (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn, доступ к которому можно получить с помощью префикса www) также предоставляет сходные руководства, касающиеся требований к рефугиям. Вследствие потерь, обусловленных воздействием насекомых в пределах зоны рефугия, при использовании более крупных рефугиев может снижаться общая урожайность.

Другим способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении вредителей-мишеней и одновременного ограничения развития вредителей, устойчивых к инсектицидам, будет создание репозитория инсектицидных генов,

эффективных в отношении групп насекомых-вредителей и проявляющих свои эффекты посредством различных механизмов действия.

Экспрессия в растении двух или больше инсектицидных композиций, токсичных для одного и того же вида насекомых, где при этом каждый инсектицид экспрессируется на эффективных уровнях, будет представлять собой другой способ для достижения контроля развития устойчивости. В его основе лежит принцип, заключающийся в том, что возникновение устойчивости к двум отдельным механизмам действия является значительно менее вероятным, чем только к одному. Например, у Roush описываются стратегии использования двух токсинов, также называемые "пирамидированием" или "пакетированием", для управления инсектицидными трансгенными сельскохозяйственными культурами. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353:1777-1786). Пакетирование или пирамидирование генов двух различных белков, каждый из которых является эффективным в отношении вредителей-мишеней, при небольшой или отсутствующей перекрестной устойчивости может обеспечивать возможность применения меньшего рефугия. Согласно требованиям Управления по охране окружающей среды США для высаживания кукурузы, не содержащей Bt, необходим существенно меньший (обычно 5%) структурированный рефугий, чем для продуктов с одним признаком (обычно 20%). Существуют различные способы обеспечения эффектов IRM рефугия, в том числе использование различных геометрических схем высаживания в полях и семенных смесей в мешках, что дополнительно обсуждается у Roush.

В некоторых вариантах осуществления один полинуклеотид, кодирующий вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, раскрытые в данном документе, являются пригодными в качестве стратегии управления устойчивостью насекомых в комбинации (т. е. в составе пирамиды). В одном варианте осуществления композиции и способы для пакетирования полинуклеотида, кодирующего один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и второй вариантный полипептид Cry1B характеризуются отличающимися механизмами действия или отличающимся участком приложения действия. В другом варианте осуществления композиции и способы для пакетирования полинуклеотида одного вариантного полипептида Cry1B вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим второй вариантный полипептид Cry1B, где второй вариантный полипептид Cry1B характеризуется активностью в отношении насекомого, устойчивого к активности первого вариантного полипептида Cry1B, также рассматриваются в раскрытии. В другом варианте осуществления каждый из первого варианта Cry1B и отличающегося второго варианта Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29

(SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29). В другом варианте осуществления первый вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), и при этом второй вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27) и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29). В другом варианте осуществления первый вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67) и IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), и при этом второй вариантный полипептид Cry1B выбран из группы, включающей: IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76) и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143) и SL8-02 (SEQ ID NO: 144).

Предусмотрены способы контроля заражения(заражений) насекомыми из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* трансгенного растения, которые обеспечивают управление устойчивостью насекомых, включающие обеспечение экспрессии в растении по меньшей мере двух различных инсектицидных белков, характеризующихся отличающимися механизмами действия.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения насекомыми из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* трансгенного растения и содействия в управлении устойчивостью насекомых предусматривают один полинуклеотид, кодирующий вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим

отличающийся второй вариантный полипептид C_{ry1B}, где первый вариантный полипептид C_{ry1B} и второй вариантный полипептид C_{ry1B} характеризуются отличающимися механизмами действия или отличающимся участком приложения действия.

Композиции согласно вариантам осуществления находят разнообразные применения в защите растений, семян и растительных продуктов. Например, композиции можно применять в способе, который предполагает помещение эффективного количества пестицидной композиции в среду обитания вредителя посредством процедуры, выбранной из группы, состоящей из опрыскивания, опыливания, разбрасывания или нанесения покрытия на семена.

Перед продажей материала для размножения растений (плода, клубня, луковицы, клубнелуковицы, зерен, семени), в особенности семени, в качестве коммерческого продукта, его обычно обрабатывают защитным покрытием, содержащим гербициды, инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскоциды или смеси некоторых из этих препаратов, при необходимости, вместе с дополнительными носителями, поверхностно-активными веществами или способствующими нанесению вспомогательными веществами, обычно используемыми в области составления, для обеспечения защиты от повреждения, вызванного бактериальными, грибковыми вредителями или животными-вредителями. Для того чтобы обработать семя, защитное покрытие можно применять по отношению к семенам либо посредством пропитки клубней или зерен жидким составом, либо посредством нанесения на них покрытия из комбинированного влажного или сухого состава. Кроме того, в особых случаях возможны другие способы применения по отношению к растениям, например, обработка, направленная на почки или плоды.

Семя растения согласно вариантам осуществления, содержащее нуклеотидную последовательность, кодирующую пестицидный белок согласно вариантам осуществления, можно обрабатывать защитным покрытием для семян, содержащим соединение для обработки семян, такое как, например, каптан, карбоксин, тирам, металаксил, пиримифос-метил и другие, которые обычно применяются в обработке семян. В одном варианте осуществления защитное покрытие для семян, содержащее пестицидную композицию согласно вариантам осуществления, применяют отдельно или в комбинации с одним из защитных покрытий для семян, обычно применяемых в обработке семян.

Считается, что гены, кодирующие пестицидные белки, можно применять для трансформации организмов, патогенных для насекомых. Такие организмы включают бакуловирус, грибы, простейшие, бактерии и нематоды.

Ген, кодирующий пестицидный белок согласно вариантам осуществления, можно вводить с помощью подходящего вектора в микроорганизм-хозяин, и указанного хозяина применять по отношению к окружающей среде, или растениям, или животным. Термин "введенный" в контексте вставки нуклеиновой кислоты в клетку означает "трансфекцию",

или "трансформацию", или "трансдукцию" и включает ссылку на встраивание нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, при этом нуклеиновая кислота может встраиваться в геном клетки (например, в хромосому, плазмиду, пластидную или митохондриальную ДНК), превращаться в автономный репликон или временно экспрессироваться (например, трансфицированная мРНК).

Могут быть выбраны микроорганизмы-хозяева, которые, как известно, заселяют "фитосферу" (филлоплан, филлосферу, ризосферу и/или ризоплан) одной или нескольких сельскохозяйственных культур, представляющих интерес. Данные микроорганизмы выбирают таким образом, чтобы они могли успешно конкурировать в конкретной среде с микроорганизмами дикого типа, обеспечивать стабильное поддержание и экспрессию гена, экспрессирующего пестицидный белок, и, желательно, обеспечивать улучшенную защиту пестицида от разрушения и инактивации в окружающей среде.

Такие микроорганизмы включают бактерии, водоросли и грибы. Особый интерес представляют микроорганизмы, такие как бактерии, например, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, и *Alcaligenes*, грибы, в частности дрожжи, например, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, и *Aureobasidium*. Особый интерес представляют такие виды бактерий фитосферы как *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* и *Azotobacter vinelandii*, а также виды дрожжей фитосферы, такие как *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odor*, *Kluyveromyces veronae*, и *Aureobasidium pollulans*. Особый интерес представляют пигментированные микроорганизмы.

Доступен ряд способов введения гена, экспрессирующего пестицидный белок, в микроорганизм-хозяин в условиях, которые создают возможность для стабильного сохранения и экспрессии данного гена. Например, можно конструировать кассеты экспрессии, которые включают нуклеотидные конструкции, представляющие интерес, функционально связанные с сигналами регуляции транскрипции и трансляции для экспрессии нуклеотидных конструкций, и нуклеотидную последовательность, гомологичную последовательности в организме-хозяине, за счет которой будет осуществляться внедрение, и/или систему репликации, функционирующую в хозяине, за счет которой будет осуществляться внедрение или стабильное поддержание.

Сигналы регуляции транскрипции и трансляции включают без ограничения промоторы, старт-сайты инициации транскрипции, операторы, активаторы, энхансеры, другие регуляторные элементы, сайты связывания рибосом, кодон инициации, сигналы терминации и т. п. См., например, патент США №№ 5039523 и 4853331; EPO 0480762A2; Sambrook; Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New

York); Davis et al., eds. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) а также литературные источники, цитируемые в этих документах.

Подходящие клетки-хозяева, причем клетки, содержащие пестицидный белок, будут обрабатывать для продления активности пестицидных белков в клетке в случае, если обработанную клетку применяют по отношению к среде обитания вредителя-мишени(вредителей-мишеней), могут включать либо прокариотов, либо эукариотов, при этом они обычно ограничены такими клетками, которые не вырабатывают веществ, токсичных для высших организмов, таких как млекопитающие. Тем не менее, организмы, которые вырабатывают вещества, токсичные для высших организмов, можно применять в том случае, когда токсин является нестабильным или уровень применения является весьма низким, чтобы избежать любой возможности токсичности в отношении млекопитающего-хозяина. В качестве хозяев особый интерес будут представлять прокариоты и низшие эукариоты, такие как грибы. Иллюстративные прокариоты, как грамотрицательные, так и грамположительные включают Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, и *Proteus*; Bacillaceae; Rhizobiaceae, такие как *Rhizobium*; Spirillaceae, такие как *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, такие как *Pseudomonas* и *Acetobacter*; Azotobacteraceae и Nitrobacteraceae. Среди эукариот представлены грибы, такие как *Phycomycetes* и *Ascomycetes*, которые включают дрожжи, такие как *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*; и дрожжи из класса *Basidiomycetes*, такие как *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* и т. п.

Характеристики, представляющие особый интерес при осуществлении выбора клетки-хозяина в целях получения пестицидного белка, включают простоту введения гена пестицидного белка в хозяина, доступность систем экспрессии, эффективность экспрессии, стабильность белка в хозяине и наличие вспомогательных генетических возможностей. Характеристики, представляющие интерес для применения в виде микрокапсулы с пестицидом, включают защитные свойства для пестицида, такие как толстые клеточные стенки, пигментация и внутриклеточная упаковка или образование телец включений; сродство к листьям; отсутствие токсичности для млекопитающих; привлекательность для поглощения вредителями; простота уничтожения и усвоение без повреждения токсина и т. п. Другие соображения включают простоту составления и обращения, экономичность, стабильность при хранении и т. п.

Организмы-хозяева, представляющие особый интерес, включают дрожжи, такие как *Rhodotorula* spp., *Aureobasidium* spp., *Saccharomyces* spp. (такие как *S. cerevisiae*), *Sporobolomyces* spp., организмы филлопланы, такие как *Pseudomonas* spp. (такие как *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Erwinia* spp. и *Flavobacterium* spp., и другие такие организмы, в том числе *Bt*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* и т. п.

Гены, кодирующие пестицидные белки согласно вариантам осуществления, можно вводить в микроорганизмы, которые размножаются на растениях (эпифиты), для доставки

пестицидных белков к потенциальным вредителям-мишеням. Эпифиты, например, могут представлять собой грамположительные или грамотрицательные бактерии.

Бактерии, колонизирующие корни, например, можно выделять из растения, представляющего интерес, посредством способов, известных из уровня техники. А именно, штамм *Bacillus cereus*, который колонизирует корни, можно выделять из корней растения (см., например, Handelsman et al. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713-718). Гены, кодирующие пестицидные белки согласно вариантам осуществления, можно вводить в *Bacillus cereus*, колонизирующую корни, при помощи стандартных способов, известных из уровня техники.

Гены, кодирующие пестицидные белки, можно вводить, например, в *Bacillus*, колонизирующую корни, посредством электротрансформации. Конкретно, гены, кодирующие пестицидные белки, можно клонировать в челночный вектор, например, pHT3101 (Lerecius et al. (1989) *FEMS Microbiol. Letts.* 60: 211-218. Челночный вектор pHT3101, содержащий последовательность гена, кодирующую конкретный пестицидный белок, можно, например, трансформировать в *Bacillus*, колонизирующую корни, посредством электропорации (Lerecius et al. (1989) *FEMS Microbiol. Letts.* 60: 211-218).

Системы экспрессии можно конструировать таким образом, чтобы пестицидные белки секретировались вне цитоплазмы грамотрицательных бактерий, таких как, например, *E. coli*. Преимущества секреции пестицидных белков представляют собой следующие: (1) избежание потенциальных цитотоксических эффектов экспрессируемого пестицидного белка и (2) улучшение эффективности очистки пестицидного белка, в том числе без ограничения повышение эффективности извлечения и очистки белка в пересчете на объем клеточного бульона и снижение времени и/или затрат на извлечение и очистку в пересчете на единицу белка.

Пестицидные белки можно создать таким образом, чтобы они секретировались в *E. coli*, например, посредством слияния подходящего сигнального пептида *E. coli* с аминоконцом пестицидного белка. Сигнальные пептиды, распознаваемые *E. coli*, можно обнаружить в белках, которые, как уже известно, секретировуются *E. coli*, например, белок OmpA (Ghrayeb et al. (1984) *EMBO J.* 3:2437-2442). OmpA представляет собой главный белок внешней мембраны *E. coli*, и, таким образом, полагают, что его сигнальный пептид является эффективным в процессе транслокации. Кроме того, сигнальный пептид OmpA не нужно модифицировать перед процессингом, что может иметь место в случае других сигнальных пептидов, например, сигнального пептида липопротеинов (Duffaud, et al., (1987) *Meth. Enzymol.* 153: 492).

Пестицидные белки согласно вариантам осуществления можно ферментировать в бактерии-хозяине, а полученные бактерии обрабатывать и применять в виде микробных распыляемых растворов таким же образом, что и штаммы Bt, которые применяли в виде инсектицидных распыляемых растворов. В случае пестицидного(пестицидных) белка(белков), которые секретировуются *Bacillus*, сигнал секреции удаляют или подвергают мутации с применением процедур, известных из уровня техники. Такие мутации и/или

делеции предотвращают секрецию пестицидного(пестицидных) белка(белков) в ростовую среду в ходе процесса ферментации. Пестицидные белки остаются в пределах клетки, а затем клетки обрабатывают с получением инкапсулированных пестицидных белков. Для данной цели можно применять любой подходящий микроорганизм. *Pseudomonas* применяли для экспрессии токсинов Bt в виде инкапсулированных белков, а полученные клетки обрабатывали и распыляли в качестве инсектицида (Gaertner et al. (1993), в: *Advanced Engineered Pesticides*, ed. Kim).

В качестве альтернативы, пестицидные белки получают посредством введения гетерологичного гена в клетку-хозяина. Экспрессия гетерологичного гена приводит непосредственно или опосредованно к выработке и сохранению пестицида внутри клетки. Затем данные клетки обрабатывают в условиях, которые продлевают активность токсина, вырабатываемого в клетке, если клетку применяют по отношению к среде обитания вредителя-мишени(вредителей-мишеней). Полученный продукт сохраняет токсичность токсина. Данные инкапсулированные природным образом пестицидные белки можно затем составлять в соответствии с традиционными методиками для применения по отношению к среде, где размещается вредитель-мишень, например, почве, воде и листе растений. См., например, EP0192319 и ссылки, цитируемые в нем.

В вариантах осуществления трансформированный микроорганизм (который включает целые организмы, клетки, споры(споры), пестицидный(пестицидные) белок(белки), пестицидный(пестицидные) компонент(компоненты), оказывающие воздействие на вредителя компонент(компоненты), мутанта(мутантов), живые или погибшие клетки и компоненты клеток, в том числе смеси живых и погибших клеток и компонентов клеток, и в том числе разрушенные клетки и компоненты клеток) или выделенный пестицидный белок можно составлять с приемлемым носителем в пестицидную(пестицидные) композицию(композиции), то есть, например, суспензию, раствор, эмульсию, распыляемый порошок, диспергируемые гранулы или пеллеты, смачиваемый порошок и эмульгируемый концентрат, аэрозоль или распыляемый раствор, пропитанные гранулы, вспомогательное вещество, наносимую в качестве покрытия пасту, коллоид, а также инкапсулированные формы, например, в полимерных веществах. Такие составленные композиции можно получать с помощью таких традиционных способов, как высушивание, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, седиментация или концентрирование культуры клеток, содержащих полипептид.

Такие композиции, раскрытые выше, можно получать посредством добавления поверхностно-активного средства, инертного носителя, консерванта, увлажнителя, стимулятора поедания, аттрактанта, средства для инкапсуляции, связующего, эмульгатора, красителя, защитного средства от УФ, буфера, средства, повышающего текучесть, или удобрений, доноров питательных микроэлементов или других препаратов, которые оказывают влияние на рост растения. Один или несколько агрохимикатов, в том числе без ограничения гербициды, инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды,

моллюскоциды, акарициды, регуляторы роста растений, вспомогательные средства для сбора урожая и удобрения, можно комбинировать с носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными средствами, обычно используемыми в области составления, или другими компонентами для облегчения обращения с продуктом и его применения по отношению к конкретным вредителям-мишеням. Подходящие носители и вспомогательные средства могут быть твердыми или жидкими и соответствуют веществам, обычно используемым в технологии составления, например, природным или регенерированным минеральным веществам, растворителям, диспергирующим веществам, смачивающим средствам, веществам, придающим клейкость, связующим или удобрениям. Активные ингредиенты согласно вариантам осуществления обычно применяют в виде композиций, и их можно применять по отношению к возделываемой площади, растению или семенам, подлежащим обработке. Например, композиции согласно вариантам осуществления можно применять по отношению к зерну при подготовке к хранению или во время хранения в зерновом бункере или элеваторе и т. д. Композиции согласно вариантам осуществления можно применять одновременно или последовательно с другими соединениями. Способы применения активного ингредиента согласно вариантам осуществления или агрохимической композиции согласно вариантам осуществления, которая содержит по меньшей мере один из пестицидных белков, вырабатываемых штаммами бактерий согласно вариантам осуществления, включают без ограничения внекорневое применение, нанесение покрытия на семена и применение по отношению к почве. Количество применений и норма применения зависят от интенсивности заражения соответствующим вредителем.

Подходящие поверхностно-активные средства включают без ограничений анионные соединения, такие как карбоксилат, например, металла; карбоксилат длинноцепочечной жирной кислоты; N-ацилсаркозинат; сложные моно- или диэфиры фосфорной кислоты с этоксилатами жирных спиртов или соли таких сложных эфиров; сульфаты жирных спиртов, такие как додецилсульфат натрия, октадецилсульфат натрия или цетилсульфат натрия; сульфаты этоксилированных жирных спиртов; этоксилированные алкилфенолсульфаты; лигнинсульфонаты; нефтяные сульфонаты; алкиларилсульфонаты, такие как алкил-бензолсульфонаты или низшие алкилнафталинсульфонаты, например, бутилнафталинсульфонат; соли сульфонируемых продуктов конденсации нафталина с формальдегидом; соли сульфонируемых продуктов конденсации фенола с формальдегидом; более сложные сульфонаты, такие как сульфонаты амидов, например, сульфонируемый продукт конденсации олеиновой кислоты и N-метилтаурина; или диалкилсульфосукцинаты, например, диоктил натрия сульфосукцинат. Неионогенные средства включают продукты конденсации сложных эфиров жирных кислот, жирных спиртов, амидов жирных кислот или жирных алкил- или алкенилзамещенных фенолов с этиленоксидом, сложные эфиры жирных кислот и эфиров многоатомных спиртов, например, сложные эфиры сорбита и жирных кислот, продукты конденсации таких сложных эфиров с этиленоксидом, например, сложные эфиры

полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, ацетиленовые гликоли, такие как 2,4,7,9-тетраэтил-5-децин-4,7-диол, или этоксилированные ацетиленовые гликоли. Примеры катионного поверхностно-активного средства включают, например, алифатический моно-, ди- или полиамин, такой как ацетат, нафтенат или олеат; или кислородсодержащий амин, такой как аминоксид полиоксиэтиленалкиламина; амины с амидными связями, полученные путем конденсации карбоновой кислоты с ди- или полиамином; или соль четвертичного аммония.

Примеры инертных материалов включают без ограничений неорганические минеральные вещества, такие как каолин, филлосиликаты, карбонаты, сульфаты, фосфаты, или растительные материалы, такие как пробка, измельченные в порошок стержни кукурузных початков, шелуха арахиса, шелуха риса и скорлупа грецких орехов.

Композиции согласно вариантам осуществления могут находиться в форме, подходящей для непосредственного применения, или в виде концентрата исходной композиции, для которого требуется разведение подходящим количеством воды или другого разбавителя перед применением. Концентрация пестицида будет варьировать в зависимости от природы конкретного состава, в частности от того, является ли он концентратом или должен применяться непосредственно. Композиция содержит 1-98% твердого или жидкого инертного носителя и 0-50% или 0,1-50% поверхностно-активного вещества. Данные композиции будут вводить при норме, обозначенной на этикетке коммерческого продукта, например, от приблизительно 0,01 фунта до 5,0 фунтов на акр в случае сухой формы и от приблизительно 0,01 пинты до 10 пинт на акр в случае жидкой формы.

В дополнительном варианте осуществления композиции, а также трансформированные микроорганизмы и пестицидные белки согласно вариантам осуществления можно обрабатывать перед составлением для продления пестицидной активности при применении по отношению к среде обитания вредителя-мишени при условии, что предварительная обработка не оказывает неблагоприятное воздействие на пестицидную активность. Такую обработку можно осуществлять посредством химических и/или физических способов при условии, что обработка не оказывает неблагоприятного влияния на свойства композиции(композиций). Примеры химических реактивов включают без ограничения галогенирующие средства; альдегиды, такие как формальдегид и глутаровый альдегид; противомикробные средства, такие как зефирин хлорид; спирты, такие как изопропанол и этанол; и фиксирующие смеси для гистологических препаратов, такие как фиксирующая смесь Буэна и фиксирующая смесь Хелли (см., например, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (W.H. Freeman and Co.)).

В других вариантах осуществления преимущественной может быть обработка полипептидов токсинов Сгу протеазой, например, трипсином, для активации белка перед применением композиции на основе пестицидного белка согласно вариантам осуществления по отношению к среде обитания вредителя-мишени. Способы активации протоксина сериновой протеазой хорошо известны из уровня техники. См., например,

Cooksey (1968) *Biochem. J.* 6:445-454; и Carroll and Ellar (1989) *Biochem. J.* 261:99-105, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Например, подходящий протокол активации включает без ограничения объединение полипептида, подлежащего активации, например, очищенного нового полипептида Cry (например, имеющего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8), и трипсина в весовом соотношении белок/трипсин 1/100 в 20 mM NaHCO₃, pH 8, и обеспечение расщепления образца при 36°C в течение 3 часов.

Композиции (в том числе трансформированные микроорганизмы и пестицидные белки согласно вариантам осуществления) можно применять по отношению к среде обитания насекомого-вредителя, например, посредством опрыскивания, мелкодисперсного распыления, опыливания, разбрасывания, нанесения покрытия или поливания, введения в почву или на нее, введения в поливную воду, посредством обработки семян или общего применения или опыливания во время, когда вредитель начал появляться, или перед появлением вредителей в качестве меры защиты. Например, пестицидный белок и/или трансформированные микроорганизмы согласно вариантам осуществления можно смешивать с зерном для защиты зерна во время хранения. В целом важно обеспечивать хороший контроль вредителей на ранних стадиях роста растения, поскольку как раз в это время растение может повреждаться наиболее сильно. В целях удобства композиции согласно вариантам осуществления могут содержать другой инсектицид, если это считается необходимым. В одном варианте осуществления композицию применяют непосредственно по отношению к почве во время высаживания в форме гранулярной композиции с носителем и погибшими клетками штамма *Bacillus* или трансформированного микроорганизма согласно вариантам осуществления. Другой вариант осуществления представляет собой гранулярную форму композиции, содержащей агрохимикат, такой как, например, гербицид, инсектицид, удобрение, инертный носитель и погибшие клетки штамма *Bacillus* или трансформированного микроорганизма согласно вариантам осуществления.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что не все соединения в равной степени эффективны против всех вредителей. Соединения согласно вариантам осуществления проявляют активность против насекомых-вредителей, которые могут включать экономически важных вредителей агрономических, лесных, тепличных продуктов, продуктов питомников, декоративных растений, продуктов пищевой и текстильной промышленности, продуктов, связанных со здоровьем людей и животных, продуктов, связанных с домашней и коммерческой структурой, товаров для дома и подвергающихся хранению продуктов. Насекомые-вредители включают насекомых, выбранных из отрядов *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* и т. д., в частности *Coleoptera* и *Lepidoptera*.

Насекомые из отряда *Lepidoptera* включают без ограничения совок, подгрызающих совок, пядениц и гелиотин семейства *Noctuidae*: *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка-ипсилон);

A. orthogonia Morrison (совка прямоугольная); *A. segetum* Denis & Schiffermüller (совка озимая); *A. subterranea* Fabricius (совка зернистая); *Alabama argillacea* Hübner (совка хлопковая американская); *Anticarsia gemmatilis* Hübner (гусеница вельветовых бобов); *Athetis mindara* Barnes и McDunnough (совка шершавая); *Earias insulana* Boisduval (совка хлопковая египетская); *E. vittella* Fabricius (совка пятнистая); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (цитрусовая совка); *Euxoa messoria* Harris (чернобокая гусеница совки); *Helicoverpa armigera* Hübner (совка щетинконогая резедовая); *H. zea* Boddie (совка кукурузная или хлопковая совка); *Heliothis virescens* Fabricius (табачная листовертка); *Hypena scabra* Fabricius (совка клеверная); *Mamestra configurata* Walker (совка Берта); *M. brassicae* Linnaeus (совка капустная); *Melanchra picta* Harris (гусеница совки); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (совка луговая); *Pseudoplusia includens* Walker (соевая совка); *Richia albicosta* Smith (личинка западной бобовой совки); *Spodoptera frugiperda* JE Smith (совка травяная); *S. exigua* Hübner (совка малая); *S. litura* Fabricius (табачная совка, гусеница, пожирающая соцветия); *Trichoplusia ni* Hübner (совка ни); огневки, чехлоноски, бабочки, строящие паутинные гнезда, конусные бабочки и вредители, скелетирующие листья, из семейств *Pyrallidae* и *Crambidae*, такие как *Achroia grisella* Fabricius (малая восковая моль); *Amyelois transitella* Walker (гусеница, повреждающая рубчики цитрусовых); *Anagasta kuehniella* Zeller (огневка мельничная); *Cadra cautella* Walker (огневка сухофруктовая); *Chilo partellus* Swinhoe (огневка кукурузная стеблевая); *C. suppressalis* Walker (желтая рисовая огневка); *C. terrenellus* Pagenstecher (огневка тростниковая стеблевая); *Corcyra cerhalonica* Stainton (огневка рисовая); *Crambus caliginosellus* Clemens (огневка кукурузная); *C. teterrellus* Zincken (огневка мятликовая); *Snaphalocrocis medinalis* Guenée (листовертка рисовая); *Desmia funeralis* Hübner (виноградная листовертка); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (дынная огневка); *D. nitidalis* Stoll (огневка огурцов-пикули); *Diatraea grandiosella* Dyar (огневка кукурузная юго-западная); *D. saccharalis* Fabricius (тростниковая огневка); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (малый кукурузный мотылек); *Eoreuma loftini* Dyar (мексиканская рисовая огневка); *Ephestia elutella* Hübner (огневка табачная (шоколадная)); *Galleria mellonella* Linnaeus (большая восковая моль); *Hedylepta accepta* Butler (тростниковая листовертка); *Herpetogramma licarsisalis* Walker (луговой мотылек); *Homocerosoma electellum* Hulst (огневка-травянка); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (луговой мотылек); *Maruca testulalis* Geyer (огневка акациевая); *Orthaga thyrsalis* Walker (чайная моль); *Ostrinia nubilalis* Hübner (кукурузный мотылек); *Plodia interpunctella* Hübner (моль индийская мучная); *Scirpophaga incertulas* Walker (огневка рисовая стеблевая); *Udea rubigalis* Guenée (огневка ржаво-коричневая); и листовертки, листовертки-почкоеды, плодожорки и гусеницы-вредители плодов из семейства *Tortricidae* *Acleris gloverana* Walsingham (западная черноголовая листовертка); *A. variana* Fernald (восточная черноголовая листовертка); *Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm (листовертка сетчатая); *Archips* spp., в том числе *A. argyrospila* Walker (листовертка плодовых деревьев) и *A. rosana* Linnaeus (европейская листовертка); *Argyrotaenia* spp.; *Bonagota salubricola* Meyrick (листовертка бразильская яблочная); *Choristoneura* spp.; *Cochylis hospes*

Walsingham (полосатая подсолнечниковая моль); *Cydia latiferreana* Walsingham (лещинная плодоярка); *C. pomonella* Linnaeus (яблонная плодоярка); *Endopiza viteana* Clemens (листовертка виноградная); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (листовертка гроздевая); *Grapholita molesta* Busck (плодоярка восточная персиковая); *Lobesia botrana* Denis и *Schiffermüller* (листовертка европейская виноградная); *Platynota flavedana* Clemens (листовертка изменчивая); *P. stultana* Walsingham (листовертка всеядная); *Spilonota ocellana* Denis и *Schiffermüller* (листовертка почковая) и *Suleima helianthana* Riley (листовертка подсолнечниковая).

Другие выбранные сельскохозяйственные вредители из отряда *Lepidoptera* включают без ограничения *Alsophila pometaria* Harris (осенний плодовой червь); *Anarsia lineatella* Zeller (моль фруктовая полосатая); *Anisota senatoria* J.E. Smith (сатурния оранжевая дубовая); *Antheraea pernyi* Guérin-Ménéville (китайский дубовый шелкопряд); *Bombyx mori* Linnaeus (тутовый шелкопряд); *Bucculatrix thurberiella* Busck (кривоусая хлопковая моль); *Colias eurytheme* Boisduval (люцерновая желтушка); *Datana integerrima* Grote и Robinson (хохлатка ореховая); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (сибирский шелкопряд); *Ennomos subsignaria* Hübner (пяденица вязовая); *Erannis tiliaria* Harris (пяденица липовая); *Erechthias flavistriata* Walsingham (листовертка почковая тростниковая); *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (шелкопряд золотистый); *Harrisina americana* Guérin-Ménéville (пироморфида американская); *Heliothis subflexa* Guenée; *Hemileuca oliviae* Cockrell (гусеница бабочки-сатурнии); *Hyphantria cunea* Drury (американская белая бабочка); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (томатная моль); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (пяденица гемлоковая восточная); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (пяденица гемлоковая западная); *Leucoma salicis* Linnaeus (волнянка ивовая); *Lymantria dispar* Linnaeus (непарный шелкопряд); *Malacosoma* spp.; *Manduca quinquemaculata* Haworth (бражник пятиточечный, томатный бражник); *M. sexta* Haworth (томатный бражник, табачный бражник); *Operophtera brumata* Linnaeus (пяденица зимняя); *Orgyia* spp.; *Paleacrita vernata* Peck (пяденица весенняя); *Papilio cresphontes* Cramer (парусник кресфонтес, "апельсиновая собака"); *Phryganidia californica* Packard (коконопряд кольчатый калифорнийский); *Phyllocnistis citrella* Stainton (цитрусовая мушка-минер); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (моль-пестрянка плодовая нижнесторонняя); *Pieris brassicae* Linnaeus (белянка капустная большая); *P. rapae* Linnaeus (белянка капустная малая); *P. napi* Linnaeus (белянка брюквенная); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пальцекрылка артишоковая); *Plutella xylostella* Linnaeus (моль капустная); *Pectinophora gossypiella* Saunders (розовый коробочный червь); *Pontia protodice* Boisduval и Leconte (клетчатая белянка); *Sabulodes aegrotata* Guenée (всеядная пяденица); *Schizura concinna* J.E. Smith (хохлатка); *Sitotroga cerealella* Olivier (моль ячменная ангумуазская); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermüller (походный шелкопряд сосновый); *Tineola bisselliella* Hummel (моль комнатная); *Tuta absoluta* Meyrick (томатная моль) и *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаевая моль плодовая).

Представляют интерес личинки и имаго из отряда *Coleoptera*, в том числе

долгоносики из семейств Anthribidae, Bruchidae и Curculionidae, в том числе без ограничения: *Anthonomus grandis* Boheman (долгоносик хлопковый); *Cylindrocopturus adspersus* LeConte (долгоносик подсолнечниковый стеблевой); *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (корневой долгоносик); *Hypera punctata* Fabricius (долгоносик листовой клеверный); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (долгоносик рисовый водяной); *Metamasius hemipterus hemipterus* Linnaeus (долгоносик западно-индийский тростниковый); *M. hemipterus sericeus* Olivier (долгоносик тростниковый); *Sitophilus granarius* Linnaeus (долгоносик амбарный); *S. oryzae* Linnaeus (долгоносик рисовый); *Smicronyx fulvus* LeConte (красный долгоносик подсолнечниковый); *S. sordidus* LeConte (серый долгоносик подсолнечниковый); *Sphenophorus maidis* Chittenden (долгоносик маисовый); *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval (долгоносик новогвинейский тростниковый); земляные блошки, огуречные жуки, корневые черви, листоеды, картофельные жуки и листовые минеры из семейства Chrysomelidae, в том числе без ограничения: *Chaetocnema ecyra* Horn (блошка стеблевая хлебная); *C. pulicaria* Melsheimer (земляная кукурузная блошка); *Colaspis brunnea* Fabricius (листоед виноградный); *Diabrotica barberi* Smith и Lawrence (северный кукурузный жук); *D. undecimpunctata howardi* Barber (южный кукурузный жук); *D. virgifera virgifera* LeConte (западный кукурузный жук); *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадский жук); *Oulema melanopus* Linnaeus (пьявица красногрудая); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блошка крестоцветная); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (подсолнечниковый листоед); жуки из семейства Coccinellidae, в том числе без ограничения: *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканская фасолевая коровка); хрущи и другие жуки из семейства Scarabaeidae, в том числе без ограничения: *Antitrogon parvulus* Britton (личинка жука, поедающая сахарный тростник); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляк северный, хрущ); *C. immaculata* Olivier (дупляк южный, хрущ); *Dermolepida albohirtum* Waterhouse (сероспинный жук, поедающий сахарный тростник); *Euethola humilis rugiceps* LeConte (тростниковый жук); *Lepidiota frenchi* Blackburn (личинка *Lepidiota*, поедающая сахарный тростник); *Tomarus gibbosus* De Geer (жук морковный); *T. subtropicus* Blatchley (личинка жука, поедающая сахарный тростник); *Phyllophaga crinita* Burmeister (хрущ); *P. latifrons* LeConte (июньский хрущ); *Popillia japonica* Newman (хрущик японский); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (нехрущ майский); кожееды из семейства Dermestidae; проволочники из семейства Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp., в том числе *M. communis* Gyllenhal (проволочник); *Conoderus* spp.; *Limonium* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короеды из семейства Scolytidae; жуки из семейства Tenebrionidae; жуки из семейства Cerambycidae, такие как без ограничения *Migdolus fryanus* Westwood (усач); и жуки из семейства Buprestidae, в том числе без ограничения *Aphanisticus cochinchinae seminulum* Obenberger (минирующая лиственная узкозлатка).

Представляют интерес имаго и незрелые особи из отряда Diptera, в том числе минирующие мушки *Agromyza parvicornis* Loew (кукурузная минирующая мушка); галлицы, в том числе без ограничения: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлица сорговая); *Mayetiola destructor* Say (гессенская муха); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt,

(подсолнечниковая галлица); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (оранжевая зерновая галлица); плодовые мушки (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (шведские мушки); личинки, в том числе без ограничения: *Delia* spp., в том числе *Delia platura* Meigen (муха ростковая); *D. coarctata* Fallen (муха озимая); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (малые комнатные мухи); *Meromyza americana* Fitch (американская меромиза); *Musca domestica* Linnaeus (комнатная муха); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалка осенняя)); мухи полевые, жигалки, мухи мясные, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; и другие мухи-вредители надсемейства Muscoidea, слепни *Tabanus* spp.; носоглоточные оводы *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; бычьи оводы *Hypoderma* spp.; пестряки *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (рунец овечий); и другие Brachycera, комары *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; мошки *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; мокрецы, москиты, сциариды и другие Nematocera.

В качестве насекомых, представляющих интерес, включены насекомые из отряда Hemiptera, такие как без ограничения следующие семейства: Adelgidae, Aleyrodidae, Aphididae, Asterolecaniidae, Cercopidae, Cicadellidae, Cicadidae, Cixiidae, Coccidae, Coreidae, Dactylopiidae, Delphacidae, Diaspididae, Eriococcidae, Flatidae, Fulgoridae, Issidae, Lygaeidae, Margarodidae, Membracidae, Miridae, Ortheziidae, Pentatomidae, Phoenicococcidae, Phylloxeridae, Pseudococcidae, Psyllidae, Pyrrhocoridae и Tingidae.

Важные с точки зрения сельского хозяйства представители из отряда Hemiptera включают без ограничения: *Acrosternum hilare* Say (клоп-щитник зеленый); *Acyrtosiphon pisum* Harris (тля гороховая); *Adelges* spp. (хермесы); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп люцерновый); *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик печальный); *Aphis craccivora* Koch (тля люцерновая); *A. fabae* Scopoli (тля бобовая); *A. gossypii* Glover (тля хлопковая, тля бахчевая); *A. maidiradicis* Forbes (тля кукурузная корневая); *A. pomi* De Geer (тля яблонная); *A. spiraeicola* Patch (тля зеленая цитрусовая); *Aulacaspis tegalensis* Zehntner (щитовка тростниковая); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (тля картофельная обыкновенная); *Bemisia tabaci* Gennadius (белокрылка табачная, белокрылка хлопковая); *B. argentifolii* Bellows и Perring (белокрылка магнолиевая); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп-черепашка пшеничный североамериканский); *Blostomatidae* spp.; *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (тля капустная); *Cacopsylla pygicola* Foerster (медяница грушевая); *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (тля земляничная американская); *Cimicidae* spp.; *Coreidae* spp.; *Corythuca gossypii* Fabricius (клоп хлопковый); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатный); *C. notatus* Distant (слепняк); *Deois flavopicta* Stål (слюнявица); *Dialeurodes citri* Ashmead (белокрылка цитрусовая); *Diuraphis chlorionis* Say (клоп-вредитель гледичии); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (тля ячменная); *Diplachionaspis divergens* Green (щитовка); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (тля яблонно-подорожниковая); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (красноклоп хлопковый); *Dysmicoccus boninsis* Kuwana (серый тростниковый мучнистый червец); *Empoasca fabae* Harris (цикадка картофельная); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (тля кровавая); *Erythroneoura* spp. (цикадки виноградные); *Eumetopina flavipes* Muir (цикадка

островная тростниковая); *Eurygaster* spp.; *Euschistus servus* Say (щитник коричневый); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (клоп однопятнистый); *Graptostethus* spp. (комплекс клопов-наземников); и *Hyalopterus pruni* Geoffroy (тля мучнистая сливовая); *Icerya purchasi* Maskell (червец желобчатый австралийский); *Labopidicola allii* Knight (жук-вредитель растений лука); *Laodelphax striatellus* Fallen (темная цикадка); *Leptoglossus corculus* Say (сосновый семенной клоп); *Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer (клоп тростниковый); *Lipaphis erysimi* Kalténbach (тля горчичная листовая); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зеленый слепняк); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп луговой); *L. hesperus* Knight (клоп луговой западный); *L. pratensis* Linnaeus (клоп травяной); *L. rugulipennis* Poppius (клоп полевой); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (тля картофельная большая); *Macrostelus quadrilineatus* Forbes (цикадка астровая); *Magicicada septendecim* Linnaeus (цикада семнадцатилетняя); *Mahanarva fimbriolata* Stål (слюнявица тростниковая); *Melanaphis sacchari* Zehntner (тля тростниковая); *Melanaspis glomerata* Green (червец черный); *Metopolophium dirhodum* Walker (тля розанно-злаковая); *Myzus persicae* Sulzer (тля оранжевая, тля персиковая зеленая); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (тля салатная зеленая); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадка зеленая); *N. nigropictus* Stål (цикадка рисовая); *Nezara viridula* Linnaeus (зеленый овощной клоп); *Nilaparvata lugens* Stål (бурая цикадка); *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (низиус вересковый); *Oebalus pugnax* Fabricius (клоп-щитник рисовый); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (ластовневый клоп); *Orthops campestris* Linnaeus; *Pemphigus* spp. (тли корневые и тли галловые); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикадка кукурузная); *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (дельфацида тростниковая); *Phylloxera devastatrix* Pergande (филлоксера гикори); *Planococcus citri* Risso (мучнистый червец цитрусовый); *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблонный); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (клоп четырехполосный травяной); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (хлопковый слепняк); *Pseudococcus* spp. (другие мучнистые червцы); *Pulvinaria elongata* Newstead (червец пушицевый); *Pyrilla perpusilla* Walker (цикадка тростниковая); *Pyrhocoridae* spp.; *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (щитовка калифорнийская); *Reduviidae* spp.; *Rhopalosiphum maidis* Fitch (тля сорговая); *R. padi* Linnaeus (тля черемуховая обыкновенная); *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (тростниковый мучнистый червец); *Schizaphis graminum* Rondani (тля злаковая обыкновенная); *Sipha flava* Forbes (тля сахарного тростника желтая); *Sitobion avenae* Fabricius (тля злаковая); *Sogatella furcifera* Horvath (цикадка белоспинная); *Sogatodes oryzicola* Muir (дельфацида рисовая); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (слепняк белокрапчатый); *Therioaphis maculata* Buckton (пятнистая люцерновая тля); *Tinidae* spp.; *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (тля померанцевая); и *T. citricida* Kirkaldy (тля цитрусовая); *Trialeurodes abutiloneus* (белокрылка полосатокрылая) и *T. vaporariorum* Westwood (белокрылка тепличная); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблошка хурмовая); и *Typhlocyba pomaria* McAtee (цикадка яблонная).

Также включены имаго и личинки из отряда Acari (клещи), такие как *Aceria tosichella* Keifer (галловый клещ пшеничный); *Panonychus ulmi* Koch (красный плодовой

клещ); *Petrobia latens* Müller (петробия многоядная); *Steneotarsonemus bancrofti* Michael (клещ, повреждающий стебель сахарного тростника); клещики паутинные и клещики красные семейства Tetranychidae, *Oligonychus grypus* Baker и Pritchard, *O. indicus* Hirst (клещ листовой тростниковый), *O. pratensis* Banks (травяной клещ Бэнкса), *O. stickneyi* McGregor (клещ паутинный тростниковый); *Tetranychus urticae* Koch (клещ паутинный двупятнистый); *T. mcdanieli* McGregor (клещик МакДэниела); *T. cinnabarinus* Boisduval (красный паутинный клещик); *T. turkestanus* Ugarov и Nikolski (туркестанский паутинный клещик); плоские клещи семейства Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisi* McGregor (оранжевый клещ); ржавчинные и почковые клещи семейства Eriophyidae и другие клещи, питающиеся листьями, и клещи, важные для здоровья человека и животных, т. е. пылевые клещи семейства Epidermoptidae, железницы семейства Demodicidae, зерновые клещи семейства Glycyphagidae, иксодовые клещи отряда Ixodidae. *Ixodes scapularis* Say (черноногий клещ); *I. holocyclus* Neumann (австралийский паралитический клещ); *Dermacentor variabilis* Say (клещ иксодовый собачий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (иксодовый клещ Amblyomma) и конские и чесоточные клещи семейств Psoroptidae, Pyemotidae и Sarcoptidae.

Представляющими интерес насекомыми-вредителями из отряда Thysanura являются, например, *Lepisma saccharina* Linnaeus (чешуйница); *Thermobia domestica* Packard (термобия).

Дополнительные охваченные вредители-артроподы включают: пауков из отряда Araneae, таких как *Loxosceles reclusa* Gertsch и Mulaik (бурый паук-отшельник) и *Latrodectus mactans* Fabricius (черная вдова), и многоножек из отряда Scutigermorpha, таких как *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (обыкновенная мухоловка). Кроме того, интерес представляют насекомые-вредители из отряда Isoptera, в том числе из семейства Termitidae, такие как без ограничения *Cylindrotermes nordenskioeldi* Holmgren и *Pseudacanthotermes militaris* Hagen (тростниковый термит). Интерес также представляют насекомые из отряда Thysanoptera, в том числе без ограничения трипсы, такие как *Stenchaetothrips minutus* van Deventer (тростниковый трипс).

Пестицидную активность композиций согласно вариантам осуществления можно тестировать на насекомых-вредителях на ранних стадиях развития, например, в виде личинок или других незрелых форм. Насекомых можно разводить в полной темноте при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C и при относительной влажности от приблизительно 30% до приблизительно 70%. Биологические анализы можно осуществлять, как описано в Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83(6): 2480-2485. Способы разведения личинок насекомых и проведения биологических анализов хорошо известны специалисту в данной области техники.

Специалисту в данной области техники известен широкий спектр методик биологических анализов. Общие процедуры включают добавление экспериментального соединения или организма к источнику пищи в закрытом контейнере. Пестицидную активность можно измерить без ограничения по изменениям смертности, потери веса,

привлечения, отпугивания, а также другим изменениям поведения и физическим изменениям после скармливания и воздействия в течение соответствующего периода времени. Биологические анализы, описанные в данном документе, можно применять с любым питающимся насекомым-вредителем на стадии личинки или имаго.

Следующие примеры представлены в качестве иллюстрации, а не для ограничения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пример 1. Получение вариантов Cry1B с улучшенным спектром инсектицидной активности

Инсектицидный белок Cry1Bd, имеющий аминокислоту под SEQ ID NO: 1 (US 8692065), обладает высокой инсектицидной активностью (ILC50=1 ppm) против личинки кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*), но низкой инсектицидной активностью (ILC50 > 1000 ppm и ~ 400 ppm соответственно) против кукурузной совки (*Helicoverpa zea*) и травяной совки (*Spodoptera frugiperda*). Инсектицидный белок Cry1B, называемый MP258 (порядковый номер PCT/US14/49923), имеющий аминокислоту под SEQ ID NO: 47, обладает высокой инсектицидной активностью (ILC50=4 ppm) против личинки кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*), но низкой инсектицидной активностью (ILC50 24 ppm и 62 ppm соответственно) против кукурузной совки (*Helicoverpa zea*) и травяной совки (*Spodoptera frugiperda*). Ряд вариантных полипептидов Cry1B, полученных из Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) и MP258, конструировали для улучшения инсектицидной активности против кукурузной совки (CEW) и/или травяной совки (FAW) по сравнению с Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) и/или MP258 (SEQ ID NO: 47), сохраняя при этом инсектицидную активность в отношении ECB. Вариантные полипептиды Cry1B, обладающие улучшенной инсектицидной активностью, которые были получены, включают указанные в таблице 1. Инсектицидную активность вариантов Cry1B определяли, как описано в примере 4, и результаты определения инсектицидной активности показаны в таблице 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей вариантных полипептидов Cry1B показано на фигуре 1.

Таблица 1

ID клона	Полипептид	Полинуклеотид
Cry1Bd	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
IP1B-B1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
IP1B-B21	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
IP1B-B22	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
IP1B-B23	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
IP1B-B24	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
IP1B-B25	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
IP1B-B26	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
IP1B-B27	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

ID клона	Полипептид	Полинуклеотид
IP1B-B28	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
IP1B-B29	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
IP1B-B31	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
IP1B-B32	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
IP1B-B33	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
IP1B-B34	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
IP1B-B40	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
IP1B-B41	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
IP1B-B42	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
IP1B-B43	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
IP1B-B44	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
IP1B-B45	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
IP1B-B46	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44
IP1B-B47	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
MP258	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
GS060	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50

Значения процентной идентичности аминокислотной последовательности вариантных полипептидов Cry1B, рассчитанные с применением алгоритма Нидлмана-Вунша, реализованного в программе Needle (набор инструментов EMBOSS), показаны в виде матричной таблицы в таблице 2. Пустая часть матричной таблицы не показана.

Таблица 2

.	GS060	IP1B-B1	IP1B-B21	IP1B-B22	IP1B-B23	IP1B-B24	IP1B-B25	IP1B-B26	IP1B-B27	IP1B-B28	IP1B-B29
Cry1Bd	65,6	95,4	84,3	82,6	82,5	84,3	84,3	84,2	83,7	83,7	83,7
GS060	-	67,0	60,1	60,2	60,1	60,1	60,2	60,1	60,0	59,9	60,1
IP1B-B1	-	-	83,4	82,6	84,5	83,4	83,4	83,2	82,9	82,9	82,9
IP1B-B21	-	-	-	95,4	96,9	99,7	99,7	99,5	99,1	99,1	99,1
IP1B-B22	-	-	-	-	95,4	95,1	95,1	95,0	94,5	94,8	94,8
IP1B-B23	-	-	-	-	-	96,6	96,6	96,5	96,0	96,0	96,0
IP1B-B24	-	-	-	-	-	-	99,4	99,2	98,8	98,8	98,8

IP1B-B25	-	-	-	-	-	-	-	99,8	99,4	99,4	99,4		
IP1B-B26	-	-	-	-	-	-	-	-	99,5	99,2	99,2		
IP1B-B27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,4	99,4		
IP1B-B28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,8		
.	IP1B-B31	IP1B-B32	IP1B-B33	IP1B-B34	IP1B-B40	IP1B-B41	IP1B-B42	IP1B-B43	IP1B-B44	IP1B-B45	IP1B-B46	IP1B-B47	MP258
Cry1Bd	80,4	80,4	81,0	82,0	83,7	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	82,3
GS060	66,6	66,9	66,3	65,5	59,8	59,9	60,1	60,1	60,1	60,1	59,9	59,9	59,9
IP1B-B1	83,6	83,0	82,7	81,6	82,8	82,9	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1	80,9
IP1B-B21	71,6	71,5	71,8	71,8	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	96,9
IP1B-B22	70,7	70,4	70,7	71,0	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,8	94,8	97,6
IP1B-B23	72,5	72,3	72,6	72,3	96,0	96,0	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,0
IP1B-B24	71,6	71,5	71,8	71,8	98,8	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	96,6
IP1B-B25	71,8	71,6	71,9	71,9	99,4	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	96,6
IP1B-B26	71,6	71,5	71,8	71,8	99,5	99,2	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	96,5
IP1B-B27	71,3	71,2	71,5	71,3	99,2	98,9	99,7	99,5	99,5	99,5	99,2	99,2	96,0
IP1B-B28	71,3	71,2	71,5	71,3	99,1	99,1	99,4	99,2	99,2	99,2	99,5	99,5	96,3
IP1B-B29	71,3	71,2	71,5	71,3	99,1	99,1	99,4	99,2	99,2	99,2	99,4	99,4	96,3
IP1B-B31	-	99,4	99,1	98,0	71,3	71,6	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	69,2
IP1B-B32	-	-	99,2	98,0	71,2	71,5	71,3	71,3	71,3	71,3	71,3	71,3	69,1
IP1B-B33	-	-	-	98,0	71,5	71,8	71,6	71,6	71,6	71,6	71,6	71,6	69,4
IP1B-B34	-	-	-	-	71,5	71,8	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	69,7
IP1B-B40	-	-	-	-	-	99,7	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,4	96,2

IP1B-B41	-	-	-	-	-	-	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,4	96,2
IP1B-B42	-	-	-	-	-	-	-	99,8	99,8	99,7	99,5	99,4	96,2
IP1B-B43	-	-	-	-	-	-	-	-	99,8	99,8	99,5	99,5	96,2
IP1B-B44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,7	99,7	99,4	96,2
IP1B-B45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,4	99,7	96,2
IP1B-B46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,7	96,3
IP1B-B47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96,3

Пример 2. Насыщающий мутагенез в выбранных положениях MP258 и IP1B вариантных полипептидов Cry1B

Полинуклеотиды под SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 42, кодирующие MP258, IP1B-B21, IP1B-B25 и IP1B-B45 (SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 41 соответственно), применяли в качестве матриц для насыщающего мутагенеза в выбранных положениях аминокислот. Конструировали обратный праймер для мутагенеза и комплементарный прямой праймер для мутагенеза для получения требуемой(требуемых) аминокислотной(аминокислотных) замены(замен) в сайте(сайтах), (представляющем)представляющих интерес. Как правило, длина праймера для мутагенеза составляла от 30 до 45 оснований, при этом два или более оснований, обычно от 10 до 15, находились по обе стороны от сайта, представляющего интерес. Для осуществления насыщающего мутагенеза применяли вырожденные праймеры, которые охватывают все возможные аминокислотные остатки. Реакции мутагенеза осуществляли с применением набора Agilent's QuikChange™ Lightning Site-Directed Mutagenesis. Материалы, предоставленные в наборе, представляют собой фермент QuikChange™ Lightning Enzyme, 10X буфер QuikChange™ Lightning Buffer, смесь dNTP, реактив QuikSolution™ и рестрикционный фермент Don согласно инструкциям производителя.

ПЦР-амплификацию, как правило, осуществляли с помощью высокопроизводительной ПЦР-системы Expand™ (Roche, Швейцария) в объеме 50 мкл, содержащем 50-100 нг матриц, 0,4-2 мкМ пары праймеров, 200 мкМ dNTP и 2 единицы ДНК-полимеразы. Реакцию мутагенеза инициировали путем предварительного нагревания реакционной смеси до 94°C в течение 3 мин. с последующими 16 циклами следующей цикловой программы: 94°C в течение 1 мин., 52°C в течение 1 мин. и 68°C в течение 8, 12, 16 или 24 мин. в зависимости от длины матрицы. Реакцию мутагенеза завершали путем инкубации при 68°C в течение 1 ч. Продукты ПЦР-амплификации оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ПЦР-продуктов QIAquick™ (Qiagen, Германия) и дополнительно обрабатывали

рестрикционным ферментом DpnI. Аликвотой продукта ПЦР, составляющей 1 мкл, как правило, трансформировали клетки BL21 (DE3), и их инокулировали в чашки со средой Лурия-Бертани (LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Отбирали приблизительно 48 или более колоний для насыщающего мутагенеза и выделяли плазмидную ДНК для секвенирования. Применяли двухстадийное секвенирование, вначале для определенного(определенных) сайта(сайтов) мутации с помощью одного праймера для секвенирования с последующим подтверждением полноразмерной последовательности с помощью нескольких праймеров для секвенирования. После подтверждения всех 19 аминокислотных мутаций посредством секвенирования, данные мутантные гены усовершенствовали для экспрессии и очистки белка.

В случае мутаций, проведенных для охвата всего домена III IP1B-B25, простирающегося от T495 по E655, из каждого сайта выбирали 48 мутантных клонов и подвергали скринингу в отношении активности против CEW, как описано в примере 4. Для секвенирования данных мутантных клонов с целью определения мутированных аминокислот среди 151 аминокислотных остатков, подвергнутых мутагенезу, секвенировали 103 сайта на основе числа мутаций, повышающих активность, и мутаций, понижающих активность. Те сайты, которые содержали мутанты, не проявляющие значительного изменения активности, не секвенировали.

Пример 3. Очистка вариантных инсектицидных белков Cry1B

Гены вариантного инсектицидного белка Cry1B экспрессировали в модифицированном векторе pMAL (№ по кат. E8000S от New England Biolabs) в виде слияния с MBP (белок, связывающий мальтозу). Вектор pMAL модифицировали с присоединением 6X His-метки к N-концу MBP после метионина в положении 1. Плазмиду, содержащую ген инсектицидного белка, клонировали в *E. coli* BL21 (DE3). Клетки BL21 выращивали на MagicMedia™ (Life Technologies), либо в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, либо в колбах на шейкере, эксплуатируемом при 250 об./мин. при 37°C в течение 8 ч., затем при 16°C в течение 64 ч. В ходе инкубации при 16°C слитый белок MBP-токсин накапливался в клетках BL21 в виде растворимого белка.

Для очистки слитого белка клетки *E. coli* собирали посредством центрифугирования и обрабатывали раствором лизоцима, состоящим из 2 мг/мл лизоцима в 50 мл натрий-фосфатного буфера с pH 8, содержащего 300 mM NaCl, 2 ед./мл эндонуклеазы (Epicentre) и 5 mM MgCl₂, в течение 3 ч. при 37°C при осторожном встряхивании. Затем обработанные лизоцимом клетки *E. coli* разрушали с помощью 1% Triton X100, и получали прозрачный лизат, содержащий белки IP-1B, посредством центрифугирования при 4000 об./мин., 30 мин. (96-луночные планшеты) или 9000 об./мин. (образцы, полученные из колбы). His-меченые белки MBP-токсин очищали из прозрачного лизата посредством аффинной хроматографии с применением агарозы NiNTA от Qiagen™, следуя стандартной процедуре производителя. Для образцов из прозрачного лизата, полученных в 96-луночных планшетах, планшеты от Pall Corporation™ (25 Harbor Park Drive, Порт Вашингтон, Нью-Йорк 11050) с 96 глубокими

лунками с фильтром применяли в качестве колонок для аффинной хроматографии. Очищенные белки-токсины, элюированные из агарозы NiNTA, пропускали через Sephadex G25 с заменой фосфатного буфера на 25 mM HEPES-NaOH, pH 8, и применяли в биологическом анализе с применением насекомых для определения инсектицидной активности. MBP отщепляли с помощью Factor Xa 1/100 (вес/вес) (New England Biolabs) при 25° C в течение ночи и удаляли от белков IP-1B посредством колоночной хроматографии на Superdex 200 на основании различия по размеру и слабой аффинности MBP в отношении Superdex.

Концентрации белка определяли посредством капиллярного электрофореза с помощью устройства LabChip™ GXII (Caliper LifeSciences). Анализ белка повторяли по меньшей мере 3 раза до тех пор, пока конечные концентрации не считались надежными в пределах предварительно определенного отклонения, составляющего менее 10%.

Пример 4. Определение инсектицидной активности вариантных белков IP-1B

Активность вариантов полипептида Cry1B против основных вредителей кукурузы, кукурузного мотылька (ECB, *Ostrinia nubilalis*), кукурузной совки (ECW, *Helicoverpa zea*) и травяной совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), определяли посредством анализов со вскармливанием, как описано в Cong, R., et al. *Proceedings of the 4th Pacific Rim Conferences on Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact*, pp.118-123, под редакцией R. J. Akhurst, C. E. Beard и P. Hughes, опубликованном в 2002 г., Канберра, Австралия. Вкратце, анализ проводили с применением искусственного рациона, содержащего инсектицидные белки. Инсектицидные белки получали, как описано в примере 1, и 10 мкл образцов белка смешивали с 40 мкл расплавленного (40-50°C) искусственного рациона для насекомых, полученного на основе готовой смеси Southland, составленной для насекомых из отряда чешуекрылых (Southland Products, Лейк-Виллидж, Арканзас), с использованием агарозы с низкой температурой плавления. Смесь рацион-инсектицидный белок помещали в каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета. Одну или несколько новорожденных личинок насекомых помещали в каждую лунку для обеспечения поедания в течение 4 дней в случае с ECW и FAW и 5 дней в случае с ECB при 28°C.

В качестве альтернативы, яйца или личинки насекомых сортировали посредством проточной цитометрии больших частиц с применением COPAS™ (параметрического анализатора и сортировщика сложных объектов), полученного от Union Biometrica (Holliston, Массачусетс), с помещением одного яйца или личинки в лунку 96-луночного титрационного микропланшета, который содержал затвердевший искусственный рацион для насекомых. Если яйца использовали для размещения в планшетах для анализа, то через 16 часов для сбора данных анализа использовали только те лунки, которые содержали вылупившихся личинок. Как правило, в результате эффективной сортировки COPAS получали уровни вылупливания 90-95%. После определенных периодов скормливания ответ насекомых на белки оценивали с применением системы с оценкой в баллах 0-3 с учетом размера и смертности личинок в каждой лунке. Если не наблюдали

ответа (или рост был нормальным), то присваивали балл 0. Если рост был несколько замедлен, то присваивали балл 1. Балл 2 означал, что у личинки значительно замедлился рост (был близким к размеру новорожденной). Балл 3 означал гибель всех личинок в лунке. Ответ в процентах (ответ) для каждой обработки рассчитывали путем деления общего балла, суммы баллов по параллельным лункам для каждой обработки, на максимально возможные баллы. Например, если одна обработка (один образец, одна доза) имела 6 параллельных лунок, то общий максимальный возможный балл составлял $3 \times 6 = 18$.

Для идентификации вариантных полипептидов CgylB, характеризующихся повышенными уровнями активности против данных вредителей кукурузы, значительно более высокими, чем активность эталонного белка, такого как немутированный эталонный белок дикого типа (например, MP258 с SEQ ID NO: 47). Вариантные полипептиды в определенных концентрациях анализировали вместе с 4 дозами эталонного белка в пределах одного 96-луночного планшета для анализа. Концентрации инсектицидных белков находились в пределах значений концентрации эталонного белка для 4 доз, предпочтительно вблизи средней точки значений концентрации для 4 доз. Каждый планшет с образцом содержал эталонный белок в значительном числе лунок, например, в 16 лунках в 4 отдельных дозах. Также каждый планшет включал до 80 мутантных белков для сравнения активности с эталонным белком. Из планшета с образцами с помощью многоканальной пипетки из каждой лунки отбирали 10 мкл образцов и переносили в один планшет для анализа, содержащий в каждой лунке 40 мкл расплавленного рациона, и перемешивали на шейкере. Данный процесс подготовки планшета для анализа повторяли 6 раз или больше с обеспечением требуемого числа планшетов для анализа. После затвердения и охлаждения рациона до 4°C новорожденные личинки насекомых помещали в каждую лунку, закрывали перфорированной пленкой Mylar и инкубировали в термостате при постоянной температуре 28°C. После определенного времени скормливания ответы насекомых оценивали под увеличительным стеклом. Значения сигмоидальной функции доза-ответ (значения ответа) преобразовывали в значения линейной функции доза-ответ, построенной методом пробит, с применением SAS-JMP®, обобщенная линейная модель, биномиальное распределение ответа, пробит). Значение ответа для каждого белка в параллелях суммировали и сравнивали с кривой доза-ответ, построенной методом пробит, для активности эталонного белка, получая новое число, называемое расчетным показателем FAE (быстрая оценка активности). Например, если мутантный белок показывал определенное пробит-значение при 40 ppm, и фактическая доза с таким же пробит-значением для эталонного белка составляла 100 ppm; тогда значение FAE составляло 2,5 (100/40). Это означает, что мутантный белок в 2,5 раза более эффективен, чем эталонный белок. Данный анализ проводили с 2 разными дозами мутантных белков за раз и повторяли 3 раза, получая 6 точек измерения расчетного показателя FAE для каждого мутанта. Средний расчетный показатель FAE называли индексом FAE. Для каждого белка рассчитывали значение двустороннего t-критерия при

сравнении 6 расчетных показателей FAE. Поправку Бонферрони применяли для оценки р-значений (число новых белков/альфа) для определения статистической значимости индекса FAE.

Еще одним способом скрининга, применяемым в данной заявке на патент, был анализ с высокими дозами (HDA). В данном способе тестируемые белки в высоких концентрациях (выше EC50) помещали в планшеты для анализа с насекомыми, как описано выше, вместе с одним или несколькими эталонными белками с известным уровнем активности при аналогичной концентрации. Данный HDA часто применяли в многоуровневых скринингах для быстрого исключения белков с низкой или отсутствующей активностью.

Еще одним применяемым способом скрининга являлся высокопроизводительный функциональный анализ (HFA). Данный анализ аналогичен FAE, но в нем применяли только одну дозу вместо 2 доз. В остальном HFA, особенно способ расчета индекса, был идентичен FAE. Следовательно, индекс HFA имел такую же значимость, что и индекс FAE.

Предсказанная точка с 50% ответом в схеме подсчета баллов называется ILC50, поскольку она представляет собой комбинацию подавления роста или питания и летальные ответы. Для определения значений ILC50 каждую обработку (одна доза) повторяли 6 раз или больше, обычно 24 раза. Инсектицидная активность вариантов Cry1B показана в таблице 3.

В таблице 4 показана инсектицидная активность против кукурузной совки для форм с аминокислотными заменами, обладающими повышенной активностью (значение $FAE \geq 1,2$) по сравнению с эталонным полипептидом MP258 (SEQ ID NO: 47), IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13) или IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41). В таблице 4 показаны номер положения и аминокислота, соответствующая положениям 50-651 в MP258 (SEQ ID NO: 47); предсказанная вторичная структура и присвоение; оценка в баллах воздействия растворителя; выравнивание аминокислотной последовательности MP258 (SEQ ID NO: 47); IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), Cry1Bh (SEQ ID NO: 52), и Cry1Bi (SEQ ID NO: 54); остов полипептида, из которого был получен вариант; вариант аминокислотной замены (например, L50R) и значение инсектицидной FAE в отношении кукурузной совки по сравнению с остовом соответствующего полипептида (MP258 - SEQ ID NO: 47, IP1B-B21 - SEQ ID NO: 5, IP1B-B25 - SEQ ID NO: 13 или IP1B-B45 - SEQ ID NO: 41).

Таблица 3

ID клона	SEQ ID NO полипептида	ECB	CEW	FAW
Cry1Bd	SEQ ID NO: 1	ILC50=1 ppm	ILC50 = >1000 ppm	ILC50 = ~ 400 ppm
IP1B-B1	SEQ ID NO: 3	ILC50=1,3 ppm	ILC50=21 ppm	ILC50=34,3 ppm

IP1B-B21	SEQ ID NO: 5		ILC50=22,4 ppm	
IP1B-B22	SEQ ID NO: 7		ILC50=27,1 ppm	
IP1B-B23	SEQ ID NO: 9		ILC50=29,2 ppm	
IP1B-B24	SEQ ID NO: 11		ILC50=12,6 ppm	
IP1B-B25	SEQ ID NO: 13		ILC50=11,91 ppm	
IP1B-B26	SEQ ID NO: 15		ILC50=8,36 ppm	
IP1B-B27	SEQ ID NO: 17		ILC50=7,99 ppm	
IP1B-B28	SEQ ID NO: 19		ILC50=7,74 ppm	
IP1B-B29	SEQ ID NO: 21		ILC50=8,45 ppm	
IP1B-B31	SEQ ID NO: 23			ILC50=2,8 ppm
IP1B-B32	SEQ ID NO: 25			ILC50=2,9 ppm
IP1B-B33	SEQ ID NO: 27			ILC50=3,0 ppm
IP1B-B34	SEQ ID NO: 29			ILC50=2,9 ppm
IP1B-B40	SEQ ID NO: 31		ILC50=5,78 ppm	
IP1B-B41	SEQ ID NO: 33		ILC50=4,54 ppm	
IP1B-B42	SEQ ID NO: 35		ILC50=6,2 ppm	
IP1B-B43	SEQ ID NO: 37		ILC50=6,7 ppm	
IP1B-B44	SEQ ID NO: 39		ILC50=6,9 ppm	
IP1B-B45	SEQ ID NO: 41		ILC50=5,7 ppm	
IP1B-B46	SEQ ID NO: 43		ILC50=8 ppm	
IP1B-B47	SEQ ID NO: 45		ILC50=6,1 ppm	
MP258	SEQ ID NO: 47	ILC50=4 ppm	ILC50=24 ppm	ILC50=62 ppm

В таблице 5 показана инсектицидная активностью против кукурузной совки для аминокислотных замен со значением FAE $\leq 1,2$ по сравнению с остовом полипептида MP258 (SEQ ID NO: 47), IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13) или IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41). В таблице 5 показаны номер положения и аминокислота, соответствующая положениям 50-651 в MP258 (SEQ ID NO: 47); остов полипептида, из которого был получен вариант; вариант аминокислотной замены (например, L50R) и значение инсектицидной FAE в отношении кукурузной совки по сравнению с остовом соответствующего полипептида (MP258 - SEQ ID NO: 47, IP1B-B21 - SEQ ID NO: 5, IP1B-B25 - SEQ ID NO: 13 или IP1B-B45 - SEQ ID NO: 41).

Таблица 4

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств. MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
59	G	Спи раль	4	G	G	G	G	G	G											
60	I	Спи раль	3	I	I	I	I	I	I											
61	N	Спи раль	27	N	N	N	N	N	N	S										
62	I	Спи раль	3	I	I	I	I	I	I											
63	A	Спи раль	19	A	A	A	A	A	A											
64	G	Спи раль	4	G	G	G	G	G	G											
65	R	Спи раль	42	R	R	R	R	R	R	B4 5	R65 Q	1,54	R65 A	1,5 3	R65 S	1,4 8	R65 G	1,3 6		
66	I	Спи раль	4	I	I	I	I	I	I											
67	L	Спи раль	27	L	L	L	L	L	L	B4 5	L67 M	2,03	L67 F	1,4 1	L67 I	1,2 7				
68	G	Спи раль	11 3	G	G	G	G	G	G	B4 5	G68 A	1,83	G68 R	1,3	G68 F	1,2 7				
69	V	Спи раль	6	V	V	V	V	V	V											
70	L	Пов орот	1	L	L	L	L	L	L	B4 5	L70 E	1,51	L70 W	1,3	L70 H	1,2 3				
71	G	Пов орот	8	G	G	G	G	G	G	B4 5	G71 S	1,33								
72	V	Вито к	22	V	V	V	V	V	V	B4 5	V72 G	1,87								
73	P	Вито к	46	P	P	P	P	P	P	B4 5	P73S	1,27	P73 G	1,3 5						

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
82	Y	Спи раль		4	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	B4 5	Y82 F	1,41								
83	S	Спи раль		85	S	S	S	S	S	S	S	B4 5	S83 E	1,97	S83 D	1,9 1	S83 G	1,8 9	S83 A	1,8 7	S83 K	1,8
												S83 H		1,7	S83 R	1,5 1	S83 Y	1,3 9	S83 L	1,3 2		
84	F	Спи раль		54	F	F	F	F	F	F	F											
85	I	Спи раль		5	I	I	I	I	L	L	I											
86	V	Спи раль		22	V	V	V	V	V	V	V											
87	G	Спи раль		10 1	G	G	G	G	G	G	G	B4 5	G87 D	1,95	G87 K	1,6 5	G87 N	1,4 4	G87 C	1,4 2	G8 7W	1,2 8
												G87 H		1,24								
88	E	Спи раль		19	E	E	E	E	E	E	E											
89	L	Спи раль		2	L	L	L	L	L	L	L											
90	W	Вито к		11	W	W	W	W	W	W	W											
91	P	Вито к		44	P	P	P	P	P	P	P	B4 5	P91S	1,64	P91 Y	1,4 9	P91 T	1,4 6	P91 D	1,2 8		
92	S	Вито к		93	S	S	S	S	S	S	K	B4 5	S92 E	2,54	S92 G	1,8 8	S92 F	1,7 2	S92 V	1,7 2	S92 L	1,7 1
												S92 T		1,47								
93	G	Вито к		14 0	G	G	G	G	G	G	G	B4 5	G93 H	1,68	G93 D	1,5 3	G93 I	1,2 8				

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
94	R	Вито к	97	R	R	R	R	R	R	R	B4 5	R94 L	2,27	R94 H	2,1 9	R94 T	1,7	R94 S	1,3 5		
95	D	Вито к	35	D	D	D	D	D	D	D	B4 5	D95 G	1,86	D95 Q	1,6 7	D95 V	1,5 5	D95 F	1,2		
96	P	Спи раль	a2	18	P	P	P	P	P	P	Q										
97	W	Спи раль	2	W	W	W	W	W	W	W											
98	E	Спи раль	35	E	E	E	E	E	E	E											
99	I	Спи раль	29	I	I	I	I	I	I	I											
100	F	Спи раль	1	F	F	F	F	F	F	F											
101	L	Спи раль	4	L	M	M	M	L	L	M											
102	E	Спи раль	40	E	E	E	E	E	E	E											
103	H	Спи раль	0	H	H	H	H	H	H	H											
104	V	Спи раль	0	V	V	V	V	V	V	V											
105	E	Спи раль	16	E	E	E	E	E	E	E											
106	Q	Спи раль	75	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	B4 5	Q10 6I	2,16	Q10 6A	1,7 7	Q10 6F	1,7 4	Q10 6G	1,7 1		
												Q10 6H	1,67	Q10 6C	1,5 2	Q10 6K	1,4 3	Q10 6V	1,3 2	Q1 06 R	1,2 9

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
213	I	Спи раль	35	I	I	I	I	V	V	I	B4 5	I213 V	1,71	I21 3T	1,6 6	I213 L	1,6 4	I213 M	1,5 3	I21 3Q	1,5
												I213 N	1,28	I21 3G	1,2 1						
214	Q	Спи раль	58	Q	Q	Q	Q	N	N	Q	B2 1	Q21 4W	3,46								
215	R	Спи раль	82	R	R	R	R	Q	Q	R											
216	Y	Спи раль	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
217	Y	Спи раль	17	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
218	E	Спи раль	86	E	E	E	E	Q	Q	E	B4 5	E218 T	1,76	E21 8A	1,6 5	E21 8H	1,6 2	E21 8S	1,5 5	E21 8I	1,5 1
												E218 V	1,33	E21 8Y	1,2 9	E21 8W	1,2 1	E21 8D	1,2 1		
219	R	Спи раль	28	R	R	R	R	E	E	R	B2 1	R21 9N	1,63								
220	Q	Спи раль	6	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q											
221	A	Спи раль	66	A	A	A	A	I	I	V	B4 5	A22 1L	2,21	A22 1Y	1,8 6	A22 1V	1,8 4	A22 1K	1,8 1	A2 21I	1,6 2
												A22 1D	1,48	A22 1G	1,4 3	A22 1H	1,4 2	A22 1W	1,3	A2 21 R	1,2 8
												A22 1T	1,25								
222	E	Спи раль	70	E	E	E	E	R	R	E	B4 5	E222 G	1,89	E22 2M	1,7 5	E22 2K	1,7 2	E22 2T	1,6 7	E22 2D	1,3 9

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
												E222 I	1,36								
223	K	Спи раль	16	K	K	K	K	Y	Y	R											
224	T	Спи раль	33	T	T	T	T	T	T	T											
225	R	Спи раль	67	R	R	R	R	E	E	R	B4 5	R22 5V	4,65	R22 5Q	2,3 7	R22 5M	2,3 2	R22 5F	2,0 7	R2 25L	2,0 4
												R22 5G	1,58	R22 5I	1,5 8	R22 5Y	1,5 5	R22 5C	1,5 4	R2 25 N	1,4 6
226	E	Спи раль	66	E	E	E	E	E	E	D	B4 5	E226 D	2,17	E22 6S	2,1 3	E22 6V	1,6 8	E22 6C	1,5 2	E22 6Y	1,4 6
												E226 R	1,33	E22 6A	1,2 4						
227	Y	Спи раль	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
228	S	Спи раль	11	S	S	S	S	S	S	S											
229	D	Спи раль	31	D	D	D	D	N	N	D											
230	Y	Спи раль	17	Y	Y	Y	Y	H	H	H	B4 5	Y23 0A	2,65	Y23 0L	1,8 3	Y23 0S	1,2 2				
231	C	Спи раль	1	C	C	C	C	C	C	C											
232	A	Спи раль	27	A	A	A	A	V	V	V											
233	R	Спи раль	87	R	R	R	R	Q	Q	Q	B4 5	R23 3K	2,13	R23 3D	1,9 6	R23 3Q	1,9 1	R23 3G	1,5 6	R2 33I	1,4 1

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
												R23 3A	1,26	R23 3Y	1,2						
234	W	Спи раль	31	W	W	W	W	W	W	W	B4 5	W23 4V	2,15	W2 34 M	2,1 5	W2 34L	2,0 6	W2 34I	1,8 7	W2 34 A	1,5 5
												W23 4R	1,55	W2 34F	1,5 2	W2 34Y	1,4 8	W2 34S	1,2 2		
235	Y	Спи раль	12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
236	N	Спи раль	71	N	N	N	N	N	N	N	B4 5	N23 6E	2,2	N23 6K	1,8 7	N23 6S	1,4 3	N23 6T	1,4 1	N2 36L	1,4 1
237	T	Спи раль	50	T	T	T	T	T	T	T											
238	G	Спи раль	8	G	G	G	G	G	G	G											
239	L	Спи раль	19	L	L	L	L	L	L	L											
240	N	Спи раль	10 0	N	N	N	N	N	N	N	B4 5	N24 0Y	1,77	N24 0A	1,5 6	N24 0M	1,5 3	N24 0S	1,5	N2 40T	1,4 9
												N24 0G	1,46	N24 0K	1,4 6	N24 0F	1,3 6	N24 0L	1,2 8	N2 40 R	1,2 6
												N24 0W	1,22	N24 0C	1,2 2						
241	N	Спи раль	92	N	N	N	N	N	N	N	B4 5	N24 1S	1,7	N24 1I	1,6 8	N24 1W	1,6 2	N24 1M	1,5 7	N2 41 K	1,4 8
												N24 1Y	1,47	N24 1V	1,3 3	N24 1L	1,2 7	N24 1C	1,2 1		

[illegible]

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств. MP258	B21	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
267	L	Спи раль	6	L	L	L	L	L	L											
268	V	Спи раль	3	V	V	V	V	V	V											
269	A	Спи раль	7	A	A	A	A	A	A											
270	L	Пов орот	9	L	L	L	L	L	L											
271	F	Пов орот	0	F	F	F	F	F	F											
272	P	Спи раль	29	P	P	P	P	P	P											
273	S	Спи раль	2	S	S	S	S	S	S											
274	Y	Спи раль	0	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
275	D	Вито к	22	D	D	D	D	D	D											
276	T	Пов орот	30	T	T	T	T	T	T											
277	R	Пов орот	58	R	R	R	R	R	R	B4 5	R27 7Q	1,35	R27 7G	1,2 7	R27 7V	1,2 3				
278	I	Пов орот	44	I	I	I	I	T	T											
279	Y	Вито к	4	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
280	P	Вито к	30	P	P	P	P	P	P	B4 5	P280 H	1,54	P28 0C	1,3 2	P28 0T	1,2 9				
281	I	Вито к	39	I	I	I	I	I	I	B4 5	I281 Q	2,16	I28 1M	1,9 3	I281 R	1,4 6	I281 K	1,3 5	I28 1S	1,3 1

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств. MP258	B21	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
401	А	Складчатый слой	1	A	A	A	A	A	A										
402	G	Складчатый слой	0	G	G	G	G	G	G										
403	I	Складчатый слой	0	I	I	I	I	T	L	V									
404	N	Складчатый слой	0	N	N	N	N	N	N	L	258	N40 4 H	3,45						
405	I	Складчатый слой	53	I	I	I	I	I	I	L									
406	L	Виток	L2	38	L	L	L	L	L	F	W	258	L406 M	1,65					
-	-				-	-	-	-	-	-	G								
-	-				-	-	-	-	-	-	I								
407	L	Виток		11 4	L	L	L	L	F	I	Y	258	L407 W	1,99					
408	T	Виток		10 7	T	T	T	T	T	T	L								
409	T	Виток		50	T	T	T	T	T	Q	E								

[illegible]

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств. MP258	B2l	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	F AE	Вариант	F AE	Вариант	F AE	Вариант	F AE
427	S	Поворот	71	S	S	S	S	I	S	T	B21	S427Y	1,44					
428	L	Складчатый слой	b8 104	L	L	L	L	Y	L	F								
429	R	Складчатый слой	57	R	R	R	R	E	R	E	B21	R429I	1,36					
-	-			-	-	-	-	R	-	R								
430	G	Складчатый слой	71	G	G	G	G	G	G	G								
431	S	Складчатый слой	56	S	S	S	S	A	S	T	B21	S431L	1,63	S431H	1,63	S431G	1,42	S431A 1,3
432	L	Складчатый слой	42	L	L	L	L	T	L	A								
433	L	Складчатый слой	39	L	L	L	L	T	L	N								

[illegible]

[illegible]

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-прив.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
467 Н	Складчатый слой	b10	1	H	H	H	H	H	H	H											
468 R	Складчатый слой		3	R	R	R	R	R	R	R											
469 L	Складчатый слой		13	L	L	L	L	L	L	L											
470 S	Виток		1	S	S	S	S	S	S	S											
471 N	Складчатый слой		2	N	N	N	N	H	H	H											
472 I	Складчатый слой		7	I	I	I	I	I	I	I											
473 R	Складчатый слой		15	R	R	R	R	G	G	G	B21	R473T	12,6	R473G	5,48	R473A	4,94	R473S	3,04	R473M	1,94
												R473N	1,43	R473K	1,42	R473D	1,39	R473Y	1,22	R473N	1,43

[illegible]

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств. MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
493	D	Вито к	30	D	D	D	D	D	D											
494	R	Вито к	20	R	R	R	R	R	R											
495	T	Вито к	49	T	T	T	T	T	T	B2 5	T495 N	1,54								
496	N	Вито к	5	N	N	N	N	N	N											
497	T	Скла дчат ый слой	60	T	T	T	T	T	T											
498	I	Скла дчат ый слой	9	I	I	I	I	I	I											
499	A	Вито к	68	A	A	A	A	G	G	B2 5	A49 9R	1,69	A49 9S	1,5 6	A49 9G	1,5 2	A49 9M	1,5	A4 99 C	1,4 9
											A49 9V	1,42	A49 9P	1,2 8	A49 9W	1,2 6				
500	T	Вито к	41	T	T	T	T	P	P											
501	N	Вито к	10 3	N	N	N	N	N	N											
502	I	Вито к	16	I	I	I	I	R	R	B2 5	I502 K	2,45	I50 2V	2,2 6	I502 A	1,9 7	I502 T	1,9 6	I50 2N	1,8 3
											I502 E	1,83	I50 2L	1,7 1	I502 Q	1,6 1	I502 P	1,5 8	I50 2H	1,5 7

[illegible]

[illegible]

[illegible]

MP258	а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
530	L	Складчатый слой	b15	8	L	L	L	L	V	V	L											
531	V	Складчатый слой		2	V	V	V	V	V	V	V											
532	R	Складчатый слой		50	R	R	R	R	R	R	R	B25	R532K	2,58	R532C	1,98	R532W	1,63	R532S	1,59	R532L	1,53
													R532V	1,49	R532H	1,37	R532G	1,24				
533	L	Складчатый слой		6	L	L	L	L	L	L	L											
534	N	Виток		52	N	N	N	N	N	N	N	B25	N534S	2,2	N534Y	1,95	N534Q	1,9	N534W	1,78	N534E	1,58
													N534H	1,51	N534D	1,49	N534L	1,48				
535	N	Виток		62	N	N	N	N	R	R	N	B25	N535M	2,96	N535Q	2,26	N535E	1,88	N535F	1,68	N535K	1,68
													N535L	1,48	N535R	1,48	N535A	1,43	N535S	1,29	N535I	1,23
													N535D	1,21								

[illegible]

[illegible]

	MP258 а.к.	2D-структ. 2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
549	P	Вито к	50	P	P	P	P	P	P	P											
550	I	Вито к	7	I	I	I	I	I	I	I											
551	Q	Вито к	90	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	B2 5	Q55 1C	2,51	Q55 1R	2,1 7	Q55 1A	1,9 8	Q55 1S	1,7 6	Q5 51 D	1,5 4
												Q55 1Y	1,34								
552	F	Вито к	10 3	F	F	F	F	F	F	F	B2 5	F552 T	1,72	F55 2V	1,6 9	F55 2W	1,5 7				
553	I	Вито к	75	I	I	I	I	T	T	T	B2 5	I553 Q	2,41	I55 3D	2,1 5	I553 R	1,9 6	I553 E	1,8 3	I55 3A	1,7 8
												I553 F	1,71	I55 3L	1,6 9	I553 P	1,6 5	I553 G	1,5	I55 3W	1,4 9
												I553 S	1,49	I55 3T	1,4 7						
554	S	Вито к	12 0	S	S	S	S	S	S	S	B2 5	S554 K	1,87	S55 4R	1,5 6	S55 4D	1,4 5	S55 4H	1,4 3	S55 4N	1,2 5
												S554 G	1,22								
555	T	Вито к	79	T	T	T	T	T	T	T	B2 5	T555 V	2,13	T55 5M	1,6 4	T55 5I	1,3 2	T55 5W	1,3		
556	S	Вито к	24	S	S	S	S	S	S	S	B2 5	S556 A	2,65	S55 6W	2,2 5	S55 6G	2,0 5	S55 6D	1,6	S55 6C	1,4 1
												S556 P	1,27								
557	T	Вито к	21	T	T	T	T	T	T	T	B2 5	T557 I	1,75	T55 7R	1,6 1	T55 7G	1,5 5	T55 7S	1,3 9	T55 7Q	1,3 8

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
563	V	Складчатый слой	5	V	V	V	V	V	V	V	B2 5	V56 3N	4,65	V56 3L	2,5 6	V56 3I	2,1	V56 3A	1,3 9		
564	R	Складчатый слой	7	R	R	R	R	R	R	R	B2 5	R56 4H	4,11	R56 4V	3,2 8	R56 4W	3,0 3	R56 4I	3,0 2	R5 64 K	2,7 1
												R56 4C	1,79	R56 4S	1,4 2	R56 4A	1,3 6				
565	Y	Складчатый слой	5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	B2 5	Y56 5F	3,4								
566	A	Складчатый слой	55	A	A	A	A	A	A	A											
567	S	Складчатый слой	2	S	S	S	S	S	S	S											
568	V	Виток	29	V	V	V	V	V	V	V	B2 5	V56 8C	2,44	V56 8A	2,3 1	V56 8E	1,8 1	V56 8F	1,8	V5 68 R	1,6 5
												V56 8G	1,54	V56 8L	1,5 2	V56 8S	1,5	V56 8W	1,3 9	V5 68 N	1,3 1
569	T	Виток	33	T	T	T	T	T	T	T	B2 5	T569 I	1,75	T56 9M	1,6 7	T56 9G	1,2 9	T56 9S	1,2		

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
576	N	Складчатый слой	26	N	N	N	N	N	N	N											
577	W	Складчатый слой	6	W	W	W	W	L	W	W	258	W57 7R	3,24	W5 77F	2,0 1	W5 77K	1,7 4	W5 77M	1,7 2	W5 77 V	1,6 3
												W57 7A	1,56	W5 77T	1,4 7	W5 77H	1,3 3	W5 77G	1,2 8	W5 77I	1,2 4
578	G	Поворот	10 9	G	G	G	G	G	G	G											
579	N	Поворот	12 0	N	N	N	N	N	N	N											
580	S	Виток	66	S	S	S	S	S	S	S											
581	N	Виток	85	N	N	N	N	S	S	N	258	N58 1S	1,83	N58 1K	1,5 7						
582	I	Виток	14	I	I	I	I	I	I	I	B2 5	I582 V	1,69								
583	F	Складчатый слой	b1 9	3	F	F	F	F	F	F	B2 5	F583 S	2,8								
584	S	Складчатый слой	71	S	S	S	S	T	T	S	B2 1	S584 R	1,21								

	MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
585	S	Складчатый слой		33	S	S	S	S	N	N	S	258	S585 R	3,33	S58 5T	2,5 3	S58 5K	2,1 7	S58 5H	2,1 4	S58 5Q	2,0 4
													S585 L	1,86	S58 5W	1,6 9	S58 5N	1,5 9	S58 5M	1,3	S58 5F	1,3
													S585 I	1,27								
586	I	Складчатый слой		73	I	I	I	I	T	T	T	258	I586 M	4,11	I58 6Y	2,7 7	I586 P	2,1 9	I586 A	1,9 7	I58 6S	1,8 4
													I586 K	1,83	I58 6R	1,7 7	I586 F	1,7 3	I586 G	1,6 5	I58 6V	1,6
													I586 Q	1,48	I58 6N	1,4 1	I586 L	1,3 5	I586 W	1,3 2	I58 6T	1,2 6
587	V	Складчатый слой		17	V	V	V	V	L	L	V	258	V58 7H	2,82	V58 7C	2,2 8	V58 7N	1,9 7	V58 7S	1,8 5	V5 87 D	1,7 6
													V58 7R	1,7	V58 7A	1,7	V58 7T	1,6 5	V58 7K	1,5 7	V5 87E	1,4 3
													V58 7W	1,4	V58 7L	1,4	V58 7Y	1,4	V58 7F	1,3 7		
588	P	Виток		77	P	P	P	P	P	P	P											
589	A	Виток		38	A	A	A	A	A	A	A											
590	T	Виток		6	T	T	T	T	T	T	T	B2 5	T590 A	1,8	T59 0D	1,5 6	T59 0F	1,5 4	T59 0S	1,3	T59 0G	1,2 6

	MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
591	A	Вито к		42	A	A	A	A	A	A	A	258	A59 1H	2,82	A59 1V	2,2 8	A59 1N	1,9 7	A59 1T	1,8 5	A5 91 D	1,7 6
													A59 1R	1,7	A59 1S	1,7	A59 1K	1,6 5	A59 1C	1,6 5	A5 91E	1,4 3
													A59 1W	1,4	A59 1L	1,4	A59 1Y	1,4	A59 1F	1,3 7	A5 91P	1,2 6
													A59 1Q	1,2								
592	T	Вито к		87	T	T	T	T	A	A	A	258	T592 Q	2,9	T59 2M	2,3 9	T59 2A	2,0 2	T59 2Y	1,8 2	T59 2N	1,8
													T592 K	1,78	T59 2P	1,7	T59 2S	1,6 3	T59 2D	1,5 7	T59 2I	1,4 1
													T592 G	1,33	T59 2F	1,2 3	T59 2V	1,2 1	T59 2W	1,2 1		
593	S	Пов орот		10 2	S	S	S	S	S	S	S	B2 1	S593 Y	1,66	S59 3G	1,4 4	S59 3R	1,2 4	S59 3V	1,2 4		
594	L	Пов орот		13 0	L	L	L	L	L	L	L											
595	D	Вито к		63	D	D	D	D	D	D	D	B2 1	D59 5R	1,83	D59 5S	1,7 7	D59 5G	1,7 4	D59 5H	1,7 2	D5 95 N	1,5 7
													D59 5V	1,55	D59 5F	1,5 4	D59 5K	1,5 2	D59 5T	1,5	D5 95 Y	1,4
													D59 5I	1,36	D59 5M	1,3	D59 5A	1,2 5	D59 5P	1,2 1		
596	N	Вито к		10 0	N	N	N	N	N	N	N	B2 1	N59 6V	2,7	N59 6T	2,4 5	N59 6I	2,1 5	N59 6S	2,1 4	N5 96 G	1,9 7

	MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
													N59 6L	1,7	N59 6W	1,5 4	N59 6Y	1,3 3	N59 6H	1,3	N5 96P	1,3
													N59 6D	1,29								
597	L	Вито к		64	L	L	L	L	L	L	L											
598	Q	Вито к		57	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	B2 1	Q59 8V	1,5	Q59 8G	1,2 7	Q59 8D	1,2 2	Q59 8I	1,2 1		
599	S	Вито к		35	S	S	S	S	S	S	S	B2 5	S599 C	1,72	S59 9Q	1,7 2	S59 9L	1,6	S59 9Y	1,4 8	S59 9T	1,4 7
													S599 V	1,44	S59 9A	1,2 7	S59 9P	1,2 4				
600	R	Вито к		58	R	R	R	R	G	G	R											
601	D	Скла дчат ый слой	b2 0	20	D	N	N	N	D	D	D	B2 1	N60 1Y	1,47	N60 1F	1,3 3	N60 1V	1,3 3	N60 1G	1,2 5	N6 01 M	1,2 4
													N60 1E	1,22								
602	F	Скла дчат ый слой		55	F	F	F	F	F	F	F	B2 5	F602 M	2,53								
603	G	Скла дчат ый слой		27	G	G	G	G	G	G	G	B2 5	G60 3M	2,12	G60 3A	2,0 4	G60 3Y	2,0 4	G60 3R	1,8 8	G6 03S	1,7 5
													G60 3L	1,57	G60 3W	1,4 6	G60 3D	1,3	G60 3T	1,2 3		

	MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
604	Y	Вито к		4	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y											
605	F	Вито к		10 8	F	F	F	F	V	V	F	258	F605 S	2,2	F60 5W	1,9 1	F60 5R	1,8 9	F60 5M	1,8 5	F60 5A	1,6 3
													F605 I	1,56	F60 5C	1,5 2	F60 5V	1,4 9	F60 5K	1,4 5	F60 5I	1,5 6
													F605 D	1,39	F60 5Y	1,3 8	F60 5N	1,3 8	F60 5Q	1,3 5	F60 5G	1,3 4
													F605 E	1,27	F60 5P	1,2 5						
606	E	Вито к		86	E	E	E	E	E	E	E	B2 1	E606 R	3,03	E60 6H	2,3 8	E60 6K	2,2 7	E60 6F	2,1 9	E60 6Q	2,1 2
													E606 W	1,83	E60 6G	1,7 8	E60 6Y	1,7 6	E60 6M	1,7 4	E60 6T	1,6 4
													E606 A	1,51	E60 6I	1,3 7	E60 6L	1,3 4	E60 6N	1,2 8		
607	S	Вито к		9	S	S	S	S	I	I	S	258	S607 R	2,59	S60 7C	1,5 8	S60 7T	1,5 8	S60 7I	1,5 5	S60 7Q	1,4 8
													S607 G	1,34	S60 7D	1,3 1	S60 7E	1,2 7	S60 7V	1,2 6		
608	T	Скла дчат ый слой		14	T	T	R	R	N	N	T	258	T608 R	2,35	T60 8S	2,2 4	T60 8V	2,2	T60 8L	1,8 8	T60 8F	1,7
													T608 G	1,5	T60 8Y	1,4 7	T60 8A	1,3 3	T60 8K	1,3 2	T60 8W	1,2 3
													T608 Q	1,22								

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
622	R	Складчатый слой	61	R	R	R	R	R	R	R											
623	N	Виток	89	N	N	N	N	N	N	N											
624	F	Виток	0	F	F	F	F	F	F	F	B25	F624A	1,27	F624M							
625	S	Виток	123	S	S	S	S	S	S	S											
626	E	Виток	83	E	E	E	E	A	A	E	258	E626K	3,16	E626G	2,6	E626R	2,0	E626T	1,8	E626H	1,8
												E626A	1,71	E626N	1,4	E626I	1,4	E626Y	1,4	E626Q	1,3
												E626P	1,31	E626S	1,2						
627	N	Виток	98	N	N	N	N	N	N	N											
628	A	Виток	19	A	A	A	A	A	A	A	B25	A628V	2,38	A628F	2,0	A628K	1,8	A628Q	1,8	A628W	1,6
												A628S	1,59	A628R	1,4	A628G	1,4	A628L	1,4	A628I	1,2
												A628D	1,21								
629	G	Виток	42	G	G	G	G	E	E	R	258	G629M	1,57	G629Q	1,4	G629R	1,4	G629P	1,3	G629A	1,3
												G629S	1,28	G629T	1,2	G629E	1,2				

[illegible]

MP258 а.к.	2D-структ.	2D-присв.	Возд. раств.	MP258	B2I	B25	B45	Bd	Bh	Bi	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
638	I	Складчатый слой	12	I	I	I	I	I	I	I											
639	P	Складчатый слой	6	P	P	P	P	P	P	P											
640	V	Поворот	33	V	V	V	V	V	V	V											
641	T	Поворот	113	T	T	T	T	T	T	T	B25	T641P	3,01	T641H	2,65	T641A	2,45	T641L	2,43	T641Q	2,31
												T641Y	2,21	T641E	2,1	T641I	1,96	T641S	1,91	T641V	1,82
												T641D	1,57	T641G	1,21						
642	A	Виток	3	A	A	A	A	A	A	A											
643	T	Виток	117	T	T	T	T	T	T	T	B25	T643L	2,72	T643A	2,09	T643Q	2,04	T643H	1,94	T643S	1,58
												T643D	1,53	T643M	1,51	T643C	1,38	T643R	1,26		
644	F			F	F	F	F	F	F	F											
645	E			E	E	E	E	E	E	E	B25	E645T	2,28	E645M	2,26	E645L	1,8	E645Y	1,77	E645A	1,73
												E645N	1,71	E645V	1,67	E645P	1,65	E645I	1,61	E645W	1,48
												E645C	1,28	E645S	1,21						

MP258 MP258 a.a.		Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
			W															
67	L	B4 5	L67P	1,12	L67 Q	1,11	L67 W	0,54	L67 A	0,52	L67E	0,5 2	L6 7Y	0,5 1	L67 T	0,51	L67 R	0,5 0
			L67S	0,49	L67C	0,48	L67 D	0,48	L67 V	0,46	L67 G	0,4 4						
68	G	B4 5	G68 D	1,16	G68 K	1,08	G68 M	0,75	G68 L	0,62	G68 V	0,6 0	G6 8S	0,5 4	G68 I	0,50	G68 N	0,5 0
			G68P	0,48	G68 W	0,37												
70	L	B4 5	L70S	1,16	L70T	1,11	L70 Q	1,10	L70 A	0,98	L70F	0,9 7	L7 0C	0,9 7	L70 N	0,96	L70 G	0,9 2
			L70 Y	0,92	L70 V	0,92	L70P	0,90	L70R	0,87	L70 D	0,8 5						
71	G	B4 5	G71 D	1,12	G71 E	1,11	G71F	1,10	G71 N	1,00	G71 R	1,0 0	G7 1K	0,9 6	G71 A	0,88	G71 I	0,8 7
			G71 Q	0,79	G71 C	0,75	G71 V	0,72	G71 L	0,61	G71 Y	0,2 6	G7 1W	0,2 5	G71 T	0,22		
72	V	B4 5	V72S	0,85	V72 R	0,84	V72 L	0,81	V72F	0,79	V72 Y	0,7 5	V7 2I	0,7 4	V72 N	0,72	V72 H	0,6 6
			V72 A	0,66	V72 W	0,64	V72 C	0,64	V72 K	0,55	V72 E	0,3 5	V7 2P	0,2 8				
73	P	B4 5	P73F	1,14	P73R	1,11	P73V	0,80	P73A	0,33								
74	F	B4 5	F74N	1,19	F74T	1,15	F74 W	1,04	F74L	1,00	F74H	0,9 1	F74 K	0,8 8	F74 A	0,82	F74 Y	0,8 0
			F74C	0,78	F74 M	0,37												
75	A	B4 5	A75 D	1,03	A75F	0,94	A75 R	0,90	A75 V	0,83	A75 L	0,5 9	A7 5T	0,5 9	A75 G	0,57	A75 I	0,2 9
76	G	B4	G76	1,15	G76	0,94	G76	0,91	G76	0,54	G76	0,5	G7	0,5	G76	0,50	G76	0,4

	MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		5	K		W		Q		H		C	2	6N	1	L		F	8
77	Q	B4 5	Q77 V	1,15	Q77F	1,13	Q77 Y	1,08	Q77 R	0,96								
79	A	B4 5	A79 E	0,98	A79 G	0,71	A79F	0,57										
80	S	B4 5	S80I	1,20	S80T	0,54												
83	S	B4 5	S83T	1,19	S83V	0,60	S83I	0,60	S83P	0,58	S83 W	0,5 3						
87	G	B4 5	G87 Y	1,10	G87S	1,05	G87F	1,01	G87 L	0,97	G87 V	0,9 2	G8 7T	0,6 9	G87 Q	0,50	G87 I	0,4 6
91	P	B4 5	P91I	1,17	P91Q	1,14	P91 W	1,13	P91G	1,05	P91F	1,0 1	P91 M	0,6 7	P91 L	0,55	P91 V	0,5 5
			P91K	0,54	P91C	0,53	P91H	0,53	P91A	0,50								
92	S	B4 5	S92K	1,03	S92 W	0,85	S92R	0,76	S92 M	0,70	S92A	0,3 9	S92 P	0,3 2				
93	G	B4 5	G93 E	0,93	G93 N	0,90	G93 V	0,86	G93 L	0,86	G93 A	0,8 3	G9 3T	0,8 2	G93 S	0,80	G93 K	0,7 5
			G93 W	0,74	G93 C	0,72	G93 R	0,69	G93 Y	0,53								
94	R	B4 5	R94E	0,99	R94 K	0,95	R94 V	0,95	R94 G	0,92	R94 A	0,8 8	R9 4W	0,8 8	R94 N	0,77	R94 I	0,7 1
			R94 M	0,70														
95	D	B4 5	D95 W	1,10	D95 T	0,94	D95 L	0,87	D95 R	0,83	D95 K	0,8 0	D9 5S	0,6 4	D95 E	0,50	D95 A	0,2 8
106	Q	B4 5	Q106 P	1,08	Q106 L	1,08	Q106 N	0,98	Q106 Y	0,96	Q106 T	0,5 2						
108	V	B4 5	V108 G	1,14	V108 K	1,14	V108 S	1,06	V108 C	1,04	V108 E	0,9 5	V1 08	0,8 3				

	MP258 MP258 а.а.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
													W					
109	R	258	R109 K	1,07	R109 A	1,05	R109 Q	1,02	R109 W	0,97	R109 H	0,92	R109 L	0,91	R109 E	0,91	R109 G	0,86
			R109 T	0,85	R109 I	0,84	R109 D	0,83	R109 F	0,79	R109 M	0,74	R109 C	0,73	R109 Y	0,49	R109 P	0,07
110	Q	258	Q110 K	1,19	Q110 D	1,18	Q110 I	1,18	Q110 M	1,14	Q110 N	1,13	Q110 E	1,09	Q110 S	1,09	Q110 O	0,89
			Q110 C	0,84	Q110 A	0,77	Q110 W	0,73	Q110 G	0,70	Q110 P	0,15						
111	Q	258	Q111 V	1,14	Q111 W	1,08	Q111 N	1,01	Q111 F	1,01	Q111 P	0,85	Q111 T	0,79	Q111 C	0,77	Q111 Y	0,50
			Q111 D	0,25														
112	I	B45	I112 K	0,93	I112 G	0,84	I112 M	0,64	I112 C	0,57	I112 T	0,57	I112 E	0,39	I112 Y	0,28	I112 N	0,28
			I112 S	0,27	I112 F	0,27	I112 D	0,26	I112 R	0,24	I112 W	0,24						
113	T	B45	T113 W	0,98	T113 F	0,82	T113 C	0,75	T113 P	0,73	T113 I	0,61						
114	E	258	E114 Q	1,15	E114 W	1,13	E114 C	0,79	E114 R	0,41	E114 P	0,09						
115	N	B45	N115 I	0,96	N115 Y	0,93	N115 M	0,91	N115 S	0,88	N115 V	0,87	N115 D	0,82	N115 L	0,69	N115 C	0,61
			N115 W	0,57	N115 K	0,51	N115 R	0,35	N115 H	0,24								

	MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
118	N	B4 5	N118 W	1,05	N118 K	0,99	N118 Y	0,92	N118 R	0,84	N118 M	0,6 0						
119	T	B4 5	T119 Y	1,00	T119 F	0,95	T119 P	0,94	T119 W	0,84	T119 L	0,7 8	T1 19 C	0,6 2	T11 9G	0,50	T11 9N	0,4 2
122	A	B4 5	A122 E	1,11	A122 L	1,06	A122 S	1,06	A122 W	1,04	A122 D	1,0 1	A1 22 V	1,0 0	A12 2K	0,96	A12 2C	0,9 6
123	R	B4 5	R123 H	0,73	R123 A	0,73	R123 Y	0,72	R123 P	0,63	R123 T	0,6 1	R1 23 V	0,6 1	R12 3L	0,61	R12 3F	0,5 7
			R123 G	0,55	R123 N	0,49	R123 S	0,49	R123 M	0,46	R123 C	0,4 3	R1 23 W	0,4 2	R12 3D	0,32	R12 3E	0,2 8
			R123 I	0,24														
125	Q	B4 5	Q125 V	1,14	Q125 I	0,96	Q125 K	0,63										
129	A	B4 5	A129 E	1,08	A129 Y	1,08	A129 R	1,07	A129 Q	1,06	A129 C	1,0 5	A1 29 M	0,9 1	A12 9G	0,90	A12 9N	0,8 7
			A129 F	0,83	A129 I	0,83												
132	R	B4 5	R132 Y	0,98	R132 A	0,96	R132 V	0,96	R132 M	0,89	R132 L	0,8 6	R1 32 Q	0,8 0	R13 2S	0,72	R13 2E	0,7 0
			R132 F	0,68	R132 D	0,66	R132 G	0,65	R132 N	0,59	R132 C	0,5 9	R1 32P	0,3 6				
133	A	B4 5	A133 D	0,87	A133 V	0,85	A133 S	0,63	A133 T	0,54	A133 G	0,4 7	A1 33P	0,3 6	A13 3H	0,33	A13 3M	0,3 2

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		Q		G															
148	A	B4 5	A148 G	1,18	A148 Q	1,00	A148 M	0,95	A148 R	0,90	A148 Y	0,87	A148 T	0,85	A148 S	0,84	A148 D	0,83	
			A148 E	0,76															
149	R	B4 5	R149 F	1,00	R149 Q	0,99	R149 H	0,94	R149 W	0,94	R149 Y	0,87	R149 P	0,84	R149 G	0,82	R149 C	0,81	
151	R	B4 5	R151 S	1,06	R151 V	0,90	R151 K	0,72	R151 M	0,69	R151 L	0,68	R151 G	0,63	R151 T	0,56	R151 Q	0,52	
			R151 A	0,50	R151 I	0,42	R151 N	0,42	R151 Y	0,39	R151 W	0,39	R151 E	0,38	R151 P	0,32	R151 D	0,32	
			R151 F	0,27															
152	S	B4 5	S152 K	1,07	S152 M	0,98	S152 C	0,95	S152 Q	0,89	S152 L	0,83	S152 I	0,76	S152 R	0,61	S152 G	0,60	
			S152 P	0,47	S152 Y	0,44	S152 F	0,41	S152 W	0,37	S152 D	0,32	S152 V	0,25					
159	I	B4 5	I159 G	0,92	I159 D	0,78	I159 S	0,59	I159 T	0,32	I159 R	0,32	I159 Y	0,29	I159 N	0,28	I159 M	0,28	
			I159 P	0,27	I159 F	0,26	I159 W	0,26	I159 E	0,26	I159 Q	0,25	I159 L	0,25					
160	A	B4 5	A160 F	1,12	A160 E	0,92	A160 P	0,89	A160 G	0,85	A160 K	0,82	A160 T	0,81	A160 O	0,75			
163	L	B4 5	L163 F	0,80	L163 Q	0,72	L163 V	0,60	L163 M	0,56	L163 C	0,28	L163 A	0,28	L163 K	0,27	L163 P	0,26	

MP258 MP258 a.a.		Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
			L163 E	0,24	L163 G	0,24	L163 S	0,24	L163 R	0,24	L163 D	0,23	L163 N	0,23				
164	D	B4 5	D164 A	0,90	D164 S	0,88	D164 G	0,81	D164 M	0,81	D164 R	0,72	D164 N	0,71	D164 L	0,63	D164 Y	0,56
			D164 V	0,54	D164 F	0,51	D164 T	0,49	D164 C	0,49	D164 I	0,42	D164 E	0,30	D164 P	0,25		
166	L	B4 5	L166 Q	1,07	L166 D	1,01	L166 M	0,98	L166 P	0,98	L166 H	0,98	L166 G	0,97	L166 R	0,96	L166 K	0,96
			L166 S	0,95	L166 N	0,92	L166 Y	0,73	L166 F	0,62	L166 S	0,95						
167	N	B4 5	N167 R	1,15	N167 G	1,13	N167 S	1,04	N167 C	0,98	N167 F	0,92	N167 E	0,90	N167 D	0,87	N167 P	0,83
			N167 I	0,67														
173	A	B4 5	A173 N	1,12	A173 P	0,97	A173 G	0,92	A173 V	0,88	A173 S	0,77	A173 E	0,56				
174	I	B4 5	I174 V	0,91	I174 Q	0,89	I174 H	0,77	I174 K	0,73	I174 G	0,72	I174 M	0,72	I174 E	0,63	I174 N	0,59
			I174 S	0,56	I174 R	0,33	I174 D	0,32										
177	Q	B4 5	Q177 F	1,10	Q177 N	1,06	Q177 H	1,05	Q177 Y	1,01	Q177 I	1,00	Q177 R	0,96	Q177 M	0,95	Q177 V	0,93
			Q177	0,89	Q177	0,78	Q177	0,74	Q177	0,40								

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		D																	
209	T	B4 5	T209 S	0,94	T209 Q	0,88	T209 I	0,75	T209 G	0,68	T209 W	0,67	T209F	0,64	T209Y	0,62	T209P	0,28	
210	S	B4 5	S210 G	1,13															
211	Q	B4 5	Q211 V	1,17	Q211 K	1,15	Q211 H	1,10	Q211 E	1,08	Q211 W	1,03	Q211F	1,01	Q211Y	1,01	Q211C	1,00	
			Q211 S	0,94	Q211 D	0,54													
212	E	B4 5	E212 F	1,05	E212 A	0,86	E212 V	0,79	E212 N	0,78	E212 P	0,77	E212C	0,72	E212T	0,68	E212G	0,64	
			E212 L	0,64	E212 Q	0,63	E212 K	0,61	E212 S	0,59	E212 R	0,56							
213	I	B4 5	I213 C	1,11	I213 S	0,98	I213 R	0,94	I213 E	0,91	I213 W	0,74	I213D	0,67	I213Y	0,63	I213F	0,62	
			I213 P	0,59	I213 H	0,58	I213 A	0,49											
214	Q	B2 1	Q214 S	1,12	Q214 F	1,05	Q214 Y	1,01	Q214 D	0,76	Q214 V	0,68	Q214C	0,67	Q214E	0,58	Q214I	0,53	
			Q214 T	0,53	Q214 H	0,52	Q214 L	0,43	Q214 G	0,40	Q214 K	0,28	Q214R	0,27					
215	R	B4 5	R215 V	0,95	R215 A	0,94	R215 I	0,85	R215 N	0,83	R215 Y	0,77	R215F	0,75	R215Q	0,73	R215K	0,72	
			R215 S	0,67	R215 G	0,66	R215 T	0,66	R215 P	0,59	R215 D	0,56	R215E	0,54					
218	E	B4	E218	1,18	E218	1,10	E218	1,10	E218	1,08	E218	0,9	E218	0,9	E218	0,55			

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
	5	G		L		C		K		R	3	18F	2	8P					
219	R	B2 1	R219 Y	1,15	R219 E	1,13	R219 W	1,08	R219 Q	0,71	R219 K	0,6 3	R2 19 D	0,5 3	R21 9P	0,23	R21 9H	0,0 7	
			R219 T	0,05	R219 M	0,03	R219 L	0,01	R219 A	0,01	R219 V	0,0 1	R2 19I	0,0 1	R21 9C	0,00			
221	A	B4 5	A221 S	1,16	A221 C	1,03	A221 E	0,91	A221 M	0,83	A221 P	0,6 2	A2 21 Q	0,5 0					
222	E	B4 5	E222 C	1,13	E222 S	1,11	E222 L	1,10	E222 F	1,10	E222 A	0,9 8	E2 22 N	0,9 8	E22 2V	0,94	E22 2W	0,9 0	
			E222 R	0,84	E222 P	0,59													
225	R	B4 5	R225 W	1,19	R225 S	1,17	R225 E	1,14	R225 A	1,02	R225 P	0,8 7	R2 25 K	0,8 5	R22 5T	0,77			
226	E	B4 5	E226 T	1,18	E226 F	1,17	E226 G	1,15	E226 W	1,13	E226 N	1,1 1	E2 26 M	1,0 5	E22 6I	1,00	E22 6L	0,9 8	
			E226 H	0,96	E226 Q	0,96													
230	Y	B4 5	Y230 F	1,19	Y230 M	1,15	Y230 R	1,01	Y230 C	0,93	Y230 T	0,9 3	Y2 30 D	0,8 8	Y23 0N	0,85	Y23 0G	0,8 1	
			Y230 I	0,63	Y230 V	0,57	Y230 P	0,53											
233	R	B4 5	R233 E	1,19	R233 V	1,10	R233 F	1,09	R233 N	1,05	R233 L	1,0 3	R2 33 M	1,0 1	R23 3S	0,87	R23 3C	0,7 8	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		R233 H	0,50																
234	W	B4 5	W23 4G	1,06	W23 4K	0,93	W23 4T	0,63	W23 4E	0,60	W23 4D	0,5 9	W2 34P	0,4 6	W2 34Q	0,45			
236	N	B4 5	N236 Q	1,18	N236 D	1,16	N236 R	1,08	N236 A	1,04	N236 I	0,9 3	N2 36 Y	0,8 9	N23 6V	0,89	N23 6G	0,5 8	
			N236 M	0,54	N236 C	0,53	N236 W	0,42											
240	N	B4 5	N240 I	1,18	N240 D	1,17	N240 V	1,16	N240 E	0,57	N240 P	0,4 4							
241	N	B4 5	N241 G	1,17	N241 F	1,16	N241 Q	1,15	N241 E	1,13	N241 T	1,1 2	N2 41 D	1,0 7	N24 1H	0,90	N24 1P	0,5 0	
			N241 R	0,49															
242	L	B4 5	L242 M	0,95	L242 I	0,93	L242 C	0,83	L242 R	0,75	L242 S	0,7 0	L2 42 Q	0,6 8	L24 2A	0,66	L24 2N	0,5 8	
			L242 F	0,49	L242 H	0,46	L242 W	0,40	L242 G	0,39	L242 Y	0,3 3	L2 42 K	0,3 2					
243	R	B4 5	R243 L	0,98	R243 A	0,86	R243 Y	0,82	R243 F	0,76	R243 H	0,7 3	R2 43 W	0,7 1	R24 3G	0,67	R24 3D	0,5 7	
			R243 P	0,46															
244	G	B4 5	G244 C	0,94	G244 L	0,72	G244 A	0,71	G244 Q	0,60	G244 S	0,5 8	G2 44 D	0,5 6	G24 4K	0,54	G24 4R	0,5 4	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		G244 Y	0,53	G244 E	0,53	G244 H	0,47	G244 M	0,47	G244 N	0,46	G244 T	0,37	G244 4V	0,28	G244 4P	0,28		
		G244 I	0,26																
245	T	B4 5	T245 P	0,96	T245 L	0,82	T245 C	0,71											
246	N	B4 5	N246 A	0,85	N246 K	0,84	N246 P	0,79	N246 E	0,78	N246 M	0,77	N246 R	0,76	N246 6F	0,66	N246 6L	0,61	
			N246 Y	0,60	N246 V	0,60	N246 I	0,58											
247	A	B4 5	A247 C	0,52	A247 N	0,52	A247 L	0,41	A247 D	0,41	A247 V	0,39	A247 W	0,39	A247 7R	0,31	A247 7F	0,30	
			A247 Y	0,30	A247 M	0,28	A247 K	0,28	A247 H	0,25									
248	E	B4 5	E248 I	1,11	E248 W	1,06	E248 H	1,01	E248 C	0,82	E248 G	0,76	E248 M	0,74	E248 8K	0,50			
252	R	B4 5	R252 L	1,09	R252 Y	1,06	R252 K	1,06	R252 G	1,05	R252 M	1,05	R252 S	0,99	R252 2Q	0,98	R252 2H	0,96	
			R252 V	0,92	R252 D	0,90	R252 E	0,79	R252 L	0,76	R252 P	0,66	R252 T	0,48					
277	R	B4 5	R277 H	1,13	R277 N	1,07	R277 C	0,95	R277 E	0,88	R277 W	0,87	R277 S	0,87	R277 7F	0,86	R277 7T	0,85	
			R277 Y	0,82	R277 D	0,70	R277 A	0,69	R277 I	0,55	R277 P	0,47							
280	P	B4	P280	1,18	P280	1,08	P280	0,98	P280	0,90	P280	0,9	P280	0,8	P280	0,86	P280	0,6	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
	5	Q		Y		V		R		F	0	0W	7	0E		0K	4		
		P280 G	0,62	P280 A	0,58	P280 S	0,54	P280 D	0,50	P280 I	0,47	P280 L	0,46						
281	I	B4 5	I281 T	1,15	I281 N	1,14	I281 Y	1,14	I281 C	1,07	I281 G	1,00	I281 F	0,94	I281 W	0,82	I281 D	0,72	
303	S	258	S303 A	1,09	S303 M	0,95	S303 L	0,70	S303 Y	0,66	S303 G	0,64	S303 I	0,61	S303 T	0,57	S303 H	0,57	
			S303 F	0,56	S303 C	0,43	S303 Q	0,39	S303 V	0,37	S303 W	0,29	S303 D	0,15	S303 K	0,13	S303 E	0,07	
			S303 R	0,03															
304	G	258	G304 N	0,22	G304 C	0,02	G304 S	0,01	G304 A	0,01	G304 I	0,01	G304 L	0,01	G304 T	0,01	G304 F	0,01	
			G304 E	0,01	G304 Q	0,01	G304 K	0,01	G304 P	0,01	G304 R	0,01	G304 H	0,01	G304 W	0,01	G304 V	0,01	
			G304 D	0,01	G304 M	0,00	G304 Y	0,00											
305	F	258	F305 A	0,07	F305 Q	0,03	F305 N	0,03	F305 M	0,02	F305 I	0,01	F305 L	0,01	F305 R	0,01	F305 G	0,01	
			F305 V	0,01	F305 K	0,01	F305 E	0,00	F305 D	0,00	F305 C	0,00	F305 W	0,00	F305 T	0,00	F305 S	0,00	
			F305 H	0,00	F305 P	0,00	F305 Y	0,00											
306	A	258	A306 Q	1,14	A306 K	0,96	A306 N	0,93	A306 S	0,87	A306 M	0,78	A306 Y	0,70	A306 H	0,50	A306 R	0,48	
			A306 W	0,44	A306 L	0,33	A306 F	0,30	A306 I	0,30	A306 V	0,26	A306 P	0,22	A306 D	0,09	A306 C	0,07	

MP258 MP258 а.а.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		A306 E	0,02																
308	T	258	T308 S	0,63	T308 A	0,03	T308 G	0,02	T308 K	0,02	T308 F	0,02	T308 2	T308 Q	0,01	T308 1	0,01	T308 8C	0,01
			T308 N	0,01	T308 E	0,01	T308 R	0,01	T308 D	0,01	T308 L	0,01	T308 1	T308 08I	0,01	T308 1	0,01	T308 8M	0,01
			T308 Y	0,01	T308 W	0,01	T308 H	0,00											
360	R	B2 1	R360 K	0,97	R360 A	0,94	R360 G	0,66	R360 H	0,63	R360 Q	0,44	R360 4	R360 E	0,28				
362	E	B2 1	N362 Q	1,20	N362 M	1,16	N362 C	0,95	N362 T	0,88									
364	R	B2 1	R364 G	1,02	R364 S	0,89	R364 A	0,39	R364 K	0,38	R364 M	0,25							
367	R	B2 1	G367 S	1,09	G367 M	0,97	G367 C	0,53	G367 F	0,38									
406	L	258	L406 I	0,76	L406 W	0,53	L406 A	0,39	L406 F	0,31	L406 C	0,29	L406 9	L406 V	0,27	L406 7	0,27	L406 6Q	0,24
			L406 N	0,23	L406 K	0,13	L406 T	0,05	L406 S	0,03	L406 Y	0,03	L406 3	L406 G	0,01	L406 2	0,01	L406 6P	0,01
			L406 E	0,01															
407	L	258	L407 E	1,13	L407 D	1,00	L407 V	0,66	L407 C	0,56	L407 F	0,46	L407 6	L407 A	0,34	L407 1	0,34	L407 7T	0,34
			L407	0,20	L407	0,17	L407	0,11	L407	0,10	L407	0,0	L407	0,0	L407	0,02	L407	0,02	L407

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		N		M		H		S		G	6	07 K	4	7Q		7P	1		
408	T	258	T408 A	0,96	T408 Y	0,54	T408 S	0,48	T408 V	0,47	T408 L	0,3 6	T4 08 M	0,3 2	T40 8Q	0,30	T40 8N	0,2 7	
			T408 R	0,26	T408 H	0,25	T408 K	0,25	T408 F	0,24	T408 P	0,2 2	T4 08 W	0,2 0	T40 8I	0,17	T40 8C	0,1 1	
			T408 G	0,08	T408 E	0,02													
409	T	258	T409 Q	0,53	T409 M	0,30	T409 A	0,26	T409 I	0,21	T409 V	0,2 0	T4 09 L	0,1 7	T40 9S	0,16	T40 9K	0,1 3	
			T409 H	0,11	T409 W	0,11	T409 E	0,10	T409 R	0,10	T409 Y	0,0 8	T4 09 N	0,0 8	T40 9F	0,05	T40 9C	0,0 2	
			T409 D	0,01	T409 P	0,01	T409 G	0,01											
411	V	258	V411 I	0,82	V411 M	0,52	V411 L	0,51	V411 C	0,32	V411 R	0,2 7	V4 11 N	0,2 1	V41 1Q	0,19	V41 1T	0,1 4	
			V411 H	0,12	V411 W	0,11	V411 A	0,10	V411 F	0,09	V411 S	0,0 8	V4 11 G	0,0 6	V41 1K	0,03	V41 1E	0,0 2	
			V411 Y	0,02	V411 D	0,01	V411 P	0,01											
418	R	B2 1	R418 S	1,13	R418 A	1,11	R418 L	1,09	R418 H	0,91	R418 D	0,8 9	R4 18I	0,8 3	R41 8V	0,78	R41 8N	0,7 6	
			R418 Y	0,76	R418 M	0,69	R418 E	0,63	R418 G	0,58	R418 Q	0,5 8	R4 18	0,5 4	R41 8F	0,43	R41 8C	0,3 6	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
														W					
		R418 P	0,14																
420	N	B2 1	N420 D	1,11	N420 Y	1,10	N420 E	1,04	N420 P	1,00	N420 G	0,9 8	N4 20 L	0,9 1	N42 0F	0,90	N42 0W	0,8 9	
			N420 V	0,81	N420 M	0,74	N420 K	0,71	N420 T	0,68	N420 H	0,6 8	N4 20 R	0,6 8	N42 0Q	0,65	N42 0S	0,6 3	
			N420 I	0,60	N420 C	0,50	N420 A	0,47											
422	R	B2 1	R422 Q	1,13	R422 S	1,13	R422 Y	1,06	R422 A	1,01	R422 T	0,9 2	R4 22 K	0,9 1	R42 2L	0,87	R42 2V	0,8 4	
			R422 N	0,79	R422 D	0,77	R422 W	0,74	R422 M	0,72	R422 G	0,6 7	R4 22 H	0,6 6	R42 2C	0,63	R42 2E	0,6 0	
			R422 F	0,59	R422 I	0,51	R422 P	0,03											
425	L	B2 1	L425 V	1,19	L425 A	1,16	L425 Y	1,15	L425 M	1,15	L425 F	1,0 8	L4 25 R	1,0 4	L42 5S	1,00	L42 5K	0,9 6	
			L425 Q	0,93	L425 I	0,93	L425 W	0,93	L425 N	0,92	L425 H	0,8 9	L4 25 T	0,8 4	L42 5E	0,83	L42 5C	0,6 7	
			L425 D	0,54															
426	N	B2 1	N426 M	1,17	N426 S	1,09	N426 D	1,05	N426 Y	1,01	N426 A	0,9 9	N4 26 V	0,9 1	N42 6E	0,83	N42 6L	0,8 3	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		N426 Q	0,83	N426 R	0,80	N426 T	0,77	N426 G	0,68	N426 F	0,59	N426 K	0,59	N426 6I	0,53	N426 6H	0,51		
		N426 C	0,34	N426 W	0,31	N426 P	0,29												
427	S	B2 1	S427 H	1,20	S427 P	1,14	S427 Q	1,13	S427 N	1,12	S427 W	1,10	S427 T	1,10	S427 7G	1,03	S427 7L	0,97	
			S427 F	0,87	S427 I	0,84	S427 E	0,83	S427 M	0,78	S427 K	0,74	S427 7A	0,73	S427 7C	0,68	S427 7D	0,55	
			S427 V	0,53	S427 R	0,48													
428	L	B2 1	L428 N	1,15	L428 Q	1,08	L428 G	1,07	L428 P	0,96	L428 T	0,92	L428 M	0,85	L428 8H	0,83	L428 8R	0,82	
			L428 S	0,82	L428 W	0,76	L428 A	0,74	L428 V	0,73	L428 E	0,72	L428 D	0,65	L428 8Y	0,63	L428 8I	0,60	
			L428 K	0,52	L428 F	0,42	L428 C	0,28											
429	R	B2 1	R429 L	1,13	R429 H	1,09	R429 W	1,09	R429 N	1,08	R429 K	1,00	R429 M	0,99	R429 9F	0,91	R429 9A	0,89	
			R429 Y	0,88	R429 Q	0,86	R429 T	0,83	R429 G	0,79	R429 V	0,73	R429 29P	0,72	R429 9E	0,65	R429 9D	0,63	
			R429 S	0,54	R429 C	0,36													
431	S	B2 1	S431 K	1,15	S431 M	1,00	S431 V	0,90	S431 T	0,87	S431 E	0,87	S431 1Y	0,86	S431 1Q	0,86	S431 1F	0,82	
			S431 R	0,81	S431 N	0,81	S431 I	0,73	S431 W	0,71	S431 P	0,61	S431 1D	0,60	S431 1C	0,32			

MP258 MP258 a.a.		Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
435	T	B2 1	T435 M	1,13	T435 W	1,01	T435 F	1,00	T435 I	0,90	T435 K	0,8 8	T4 35 Q	0,8 2	T43 5V	0,79	T43 5S	0,5 8
			T435 N	0,57	T435 D	0,55	T435 E	0,52	T435 A	0,52	T435 R	0,4 7	T4 35 C	0,2 4	T43 5G	0,20	T43 5P	0,0 4
437	G	B2 1	G437 M	1,15	G437 T	1,13	G437 Y	1,00	G437 F	0,95	G437 H	0,9 4	G4 37 V	0,8 8	G43 7W	0,88	G43 7L	0,8 4
			G437 I	0,75	G437 E	0,67	G437 D	0,62	G437 P	0,36	G437 C	0,2 6						
439	T	B2 1	T439 S	1,20	T439 F	1,16	T439 V	1,16	T439 A	1,15	T439 H	1,0 8	T4 39 N	0,9 9	T43 9Y	0,92	T43 9I	0,8 9
			T439 K	0,83	T439 R	0,80	T439 L	0,79	T439 G	0,67	T439 D	0,6 4	T4 39 E	0,5 8	T43 9W	0,54	T43 9C	0,1 7
			T439 P	0,02														
444	Q	B2 1	Q444 E	0,91	Q444 M	0,89	Q444 A	0,62	Q444 H	0,58	Q444 T	0,5 3	Q4 44 L	0,4 8	Q44 4S	0,48	Q44 4V	0,4 7
			Q444 F	0,34	Q444 D	0,31	Q444 N	0,28	Q444 K	0,28	Q444 Y	0,2 6	Q4 44 W	0,2 4	Q44 4I	0,18	Q44 4G	0,1 2
			Q444 C	0,10	Q444 R	0,05	Q444 P	0,01										
447	D	B2 1	D447 Q	1,17	D447 Y	1,16	D447 K	1,01	D447 G	0,94	D447 F	0,9 4	D4 47 H	0,9 4	D44 7T	0,88	D44 7W	0,7 8

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		D447 R	0,63	D447 P	0,52	D447 C	0,52												
473	R	B2 1	R473 H	1,07	R473 C	1,07	R473 L	1,02	R473 Q	1,02									
476	S	B2 1	I476 K	1,13	I476 T	1,12	I476 N	1,07	I476 C	0,84	I476 R	0,5 9	I47 6D	0,4 0	I47 6A	0,29			
477	G	B2 1	G477 R	1,04	G477 T	1,01	G477 Q	0,90	G477 K	0,53	G477 H	0,4 2	G4 77 M	0,4 1	G47 7E	0,33	G47 7F	0,2 5	
			G477 Y	0,24	G477 C	0,13	G477 W	0,04											
478	N	B2 1	N478 Q	1,14	N478 R	1,12	N478 H	1,06	N478 T	1,04	N478 L	0,8 8	N4 78 V	0,8 2	N47 8M	0,68	N47 8I	0,5 9	
			N478 D	0,31	N478 F	0,26	N478 C	0,13											
479	T	B2 1	T479 G	1,00	T479 I	0,93	T479 L	0,81	T479 S	0,75	T479 A	0,6 6	T4 79 N	0,5 0	T47 9Q	0,44	T47 9Y	0,4 0	
			T479 P	0,40	T479 R	0,30	T479 M	0,23	T479 F	0,19	T479 W	0,1 8							
481	R	B2 1	R481 K	0,65	R481 L	0,48	R481 W	0,30	R481 Y	0,23	R481 N	0,1 8	R4 81 T	0,1 8	R48 1D	0,15	R48 1F	0,1 4	
			R481 A	0,13	R481 S	0,13	R481 G	0,07	R481 E	0,04									
492	A	B2 5	A492 S	0,93	A492 C	0,70	A492 V	0,69	A492 G	0,38									
498	I	B2 5	I498 V	1,02	I498 E	0,93	I498 L	0,90	I498 C	0,65	I498 W	0,4 7	I49 8M	0,4 3	I49 8Y	0,37	I49 8A	0,2 8	

	MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
			I498 R	0,27														
499	A	B2 5	A499 D	1,09														
503	I	B2 5	I503 C	0,63	I503 L	0,59	I503 V	0,44										
504	T	B2 5	T504 S	0,78	T504 G	0,66	T504 A	0,63	T504 C	0,60	T504 Q	0,5 2						
505	Q	B2 5	Q505 C	0,34	Q505 L	0,28	Q505 E	0,26	Q505 S	0,20								
506	I	B2 5	I506 L	0,96	I506 V	0,94	I506 W	0,19	I506 A	0,11								
507	P	B2 5	P507 A	0,44	P507 G	0,34	P507 S	0,29										
508	A	B2 5	A508 V	0,91	A508 M	0,64	A508 S	0,48	A508 I	0,23								
509	V	B2 5	V509 I	0,95	V509 C	0,86	V509 N	0,86	V509 G	0,83	V509 S	0,7 2	V5 09 A	0,6 7	V50 9W	0,57	V50 9M	0,5 5
			V509 D	0,31	V509 E	0,24												
511	G	B2 5	G511 A	0,88	G511 S	0,62												
512	N	258	N512 S	1,13	N512 C	1,10	N512 H	1,08	N512 L	1,05	N512 T	1,0 4	N5 12F	0,9 6	N51 2A	0,82		
513	F	B2 5	F513 R	1,18	F513 A	1,02	F513 Y	0,91	F513 M	0,75								
514	L																	
515	F	B2 5	F515 W	1,04	F515 G	0,60	F515 R	0,56	F515 V	0,53	F515 Q	0,5 1	F51 5K	0,5 0	F51 5T	0,45	F51 5A	0,4 4

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		R		L		I													
537	G	258	G537 L	1,18	G537 M	1,17	G537 I	1,06	G537 C	0,95	G537 P	0,57							
538	N	258	N538 K	1,17	N538 Y	0,98	N538 R	0,80											
539	N	B2 5	N539 D	0,95	N539 A	0,92	N539 S	0,88	N539 H	0,79	N539 E	0,77	N539 L	0,72	N539 A	0,60	N539 F	0,57	
			N539 T	0,57	N539 V	0,56	N539 G	0,51	N539 C	0,49	N539 W	0,43	N539 Y	0,39	N539 R	0,18	N539 K	0,17	
540	I	B2 5	I540 V	0,90	I540 H	0,86	I540 S	0,84	I540 P	0,84	I540 L	0,82	I540 G	0,51	I540 C	0,50	I540 R	0,17	
541	Q	258	Q541 H	0,92	Q541 G	0,71	Q541 A	0,62	Q541 S	0,54	Q541 E	0,39	Q541 C	0,37	Q541 T	0,30	Q541 L	0,30	
			Q541 K	0,20	Q541 R	0,12													
542	N	B2 5	N542 R	0,87	N542 M	0,86	N542 A	0,65	N542 L	0,64	N542 Y	0,63	N542 H	0,61	N542 T	0,53	N542 C	0,52	
			N542 S	0,50	N542 G	0,41	N542 V	0,31	N542 I	0,24	N542 P	0,05							
543	R	258	R543 Y	0,1104	R543 H	0,0972	R543 G	0,068	R543 W	0,06	R543 M	0,0587	R543 L	0,0419	R543 K	0,0394	R543 S	0,033	
			R543 A	0,0329	R543 V	0,0262	R543 C	0,0171	R543 Q	0,0079	R543 P	0,0079	R543 D	0,0002	R543 T	0,0011	R543 E	0,0002	
545	Y	258	Y545	0,39	Y545	0,34	Y545	0,28	Y545	0,26	Y545	0,2	Y545	0,2	Y545	0,24	Y545	0,2	

	MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE	Вариант FAE
			A	L	C	V	H	6	45 N	5	5W		5T	1				
			Y545 K	0,19	Y545 R	0,11	Y545 D	0,10	Y545 G	0,08	Y545 I	0,07	Y545 Q	0,07	Y545 E	0,06	Y545 P	0,04
546	L	B2 5	I546 V	1,04	I546 L	1,02	I546 M	1,01	I546 F	0,80	I546 S	0,32	I546 G	0,23				
547	E	258	E547 K	1,11	E547 V	1,04	E547 R	1,01	E547 Y	0,94	E547 T	0,85	E547 H	0,78	E547 P	0,75	E547 L	0,58
			E547 C	0,53	E547 W	0,28	E547 D	0,28	E547 F	0,27								
548	V	B2 5	V548 L	1,02	V548 S	0,58	V548 A	0,57	V548 G	0,45	V548 W	0,26						
549	P	B2 5	P549 Y	0,52	P549 V	0,38	P549 T	0,50	P549 S	0,75	P549 R	1,03	P549 M	0,55	P549 L	0,86	P549 G	1,73
			P549 D	0,78	P549 C	0,89												
550	I	B2 5	I550 V	0,96	I550 L	0,95	I550 A	0,61	I550 F	0,45								
551	Q	B2 5	Q551 V	1,12	Q551 F	1,09	Q551 M	1,05	Q551 G	1,01	Q551 E	0,93	Q551 N	0,87	Q551 L	0,85		
552	F	B2 5	F552 C	1,10	F552 D	1,06	F552 G	1,00	F552 A	0,98	F552 Q	0,80	F552 R	0,51				
553	I	B2 5	I553 N	1,12														
554	S	B2 5	S554 M	0,93														
555	T	B2	T555	1,13	T555	1,13	T555	0,85	T555	0,78	T555	0,2						

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
	5	R		C		S		G		L	7								
557	T	B2 5	T557 L	1,16	T557 W	1,05													
558	R	B2 5	R558 A	1,11															
559	Y	B2 5	Y559 L	0,67	Y559 M	0,63	Y559 V	0,61	Y559 A	0,47	Y559 E	0,43	Y559 T	0,27	Y559 S	0,17	Y559 D	0,10	
			Y559 R	0,10	Y559 P	0,07	Y559 G	0,05											
563	V	B2 5	V563 G	1,05	V563 S	0,69	V563 C	0,68	V563 T	0,54	V563 E	0,05							
564	R	B2 5	R564 M	1,04	R564 G	0,78	R564 L	0,24	R564 P	0,20									
568	V	B2 5	V568 P	1,17															
569	T	B2 5	T569 V	1,19	T569 E	1,15	T569 L	1,12	T569 R	1,10	T569 W	1,02	T569 K	0,82	T569 A	0,58	T569 Y	0,35	
570	P	258	P570 A	1,15	P570 K	1,07	P570 G	1,07	P570 Y	1,07	P570 V	1,06	P570 H	1,05	P570 O	1,03	P570 I	1,03	
			P570 S	0,89	P570 Q	0,79	P570 N	0,79	P570 C	0,70	P570 D	0,52	P570 L	0,47					
571	I	B2 5	I571 E	1,09	I571 A	0,90													
572	Q	258	Q572 G	1,16	Q572 T	1,07	Q572 Y	1,07	Q572 N	0,87	Q572 E	0,75	Q572 D	0,75	Q572 C	0,57			
574	S	258	S574 V	0,82	S574 I	0,76	S574 M	0,69	S574 W	0,64	S574 Q	0,64	S574 F	0,56	S574 Y	0,56	S574 A	0,53	

MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
		S574 N	0,48	S574 L	0,38	S574 E	0,32	S574 P	0,29	S574 C	0,29	S574 9	0,2	S574 4D	0,2				
577	W	258	W57 7L	1,18	W57 7N	1,16	W57 7C	1,08	W57 7S	1,04	W57 7P	0,97	W57 7D	0,92	W57 7E	0,81			
581	N	258	N581 I	1,02	N581 G	1,02	N581 F	1,00	N581 T	0,90	N581 V	0,86	N581 H	0,70	N581 Y	0,64	N581 M	0,63	
			N581 P	0,63	N581 W	0,58	N581 E	0,57	N581 Q	0,46	N581 A	0,42	N581 L	0,32	N581 1D	0,29	N581 1C	0,13	
			N581 R	0,00															
584	S	B2 1	S584 K	1,14	S584 G	1,11	S584 A	1,00	S584 Q	0,90	S584 V	0,81	S584 4C	0,78	S584 4N	0,67	S584 4Y	0,66	
			S584 L	0,66	S584 H	0,65	S584 T	0,64	S584 F	0,59	S584 I	0,54	S584 4M	0,41	S584 4W	0,38	S584 4D	0,31	
			S584 E	0,21	S584 P	0,12													
585	S	258	S585 E	1,11	S585 Y	1,09	S585 G	0,93	S585 P	0,79	S585 A	0,74	S585 5D	0,67	S585 5C	0,60	S585 5V	0,47	
590	T	B2 5	T590 K	1,00	T590 V	0,98	T590 M	0,73	T590 W	0,72	T590 L	0,54	T590 9R	0,53	T590 0E	0,52	T590 0P	0,15	
591	A	258	A591 I	1,17	A591 G	1,17	A591 M	0,94											
592	T	258	T592 E	1,04	T592 C	0,66													
593	S	B2 1	S593 A	1,10	S593 F	1,07	S593 L	1,06	S593 Q	1,06	S593 T	1,00	S593 3M	0,96	S593 3H	0,92	S593 3D	0,89	

	MP258 MP258 a.a.	Остов	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE	Вариант	FAE
			H		T		L											
606	E	B2 1	E606 C	1,15	E606 V	1,03	E606 S	0,97	E606 D	0,85	E606 P	0,3 9						
607	S	258	S607 N	1,14	S607 H	1,08	S607 K	1,01	S607 M	1,01	S607 W	1,0 1	S60 7Y	0,9 0	S60 7P	0,86	S60 7F	0,8 3
			S607 L	0,75														
608	T	258	T608 M	1,19	T608 H	1,16	T608 E	1,05	T608 D	0,98	T608 P	0,6 8	T6 08I	0,5 3	T60 8C	0,53	T60 8N	0,5 0
609	N	B2 5	N609 D	0,74														
612	T	B2 5	T612 A	1,17	T612 L	1,09	T612 K	0,97	T612 Y	0,86	T612 W	0,8 4	T6 12I	0,5 3				
613	S	B2 5	S613 E	1,01	S613 L	0,98	S613 A	0,97										
614	A	B2 5	A614 W	1,15	A614 P	1,14	A614 Q	0,98										
617	N	B2 5	N617 E	1,19	N617 S	1,14	N617 F	0,96										
618	V	258	V618 F	1,17	V618 Y	1,11	V618 M	1,10	V618 A	1,10	V618 P	1,0 7	V6 18 E	1,0 5	V61 8K	1,03	V61 8I	0,9 4
			V618 S	0,70	V618 C	0,69	V618 Q	0,67										
620	G	B2 5	G620 S	0,38	G620 A	0,35	G620 E	0,27	G620 L	0,25	G620 F	0,2 3	G6 20 K	0,2 3	G62 0V	0,23	G62 0Q	0,2 2
			G620 W	0,21	G620 R	0,20	G620 M	0,15										
622	R	B2	R622	0,28	R622	0,20	R622	0,19	R622	0,09								

Пример 5. Временная экспрессия в листьях маиса и биологический анализ с насекомыми

Полинуклеотиды, кодирующие варианты полипептиды Cry1B, клонировали в векторы для временной экспрессии под контролем убиквитинового промотора маиса (Christensen and Quail, (1996) *Transgenic Research* 5:213-218) и дублированной версии промотора из вируса мозаики мирабилис (DMMV PRO; Dey and Maiti, (1999) *Plant Mol. Biol.*, 40:771-82). Из уровня техники хорошо известен агроинфильтрационный способ введения суспензии клеток *Agrobacterium* в клетки интактных тканей растения для того, чтобы можно было измерить или изучить воспроизводимые инфицирование и дальнейшую экспрессию трансгена, полученного из растения (Kapila, et. al., (1997) *Plant Science* 122:101-108). Вкратце, молодые проростки маиса подвергали агроинфильтрации с помощью нормализованных культур бактериальных клеток тестируемых и контрольных штаммов. Листовые диски получали из каждого проростка и заражали WCRW (*Diabrotica virgifera*) вместе с соответствующими контролями. Степень поедания зеленых тканей листа оценивали через 2 дня после заражения.

Пример 6. Временная экспрессия в листьях кустовой фасоли и биологический анализ с насекомыми

Можно сконструировать кодирующие последовательности, оптимизированные для экспрессии в сое. Из уровня техники хорошо известен агроинфильтрационный способ введения суспензии клеток *Agrobacterium* в клетки интактных тканей растения для того, чтобы можно было измерить или изучить воспроизводимые инфицирование и дальнейшую экспрессию трансгена, полученного из растения (Kapila, et. al., (1997) *Plant Science* 122:101-108). Вкратце, вырезанные листовые диски кустовой фасоли подвергали агроинфильтрации с помощью нормализованных культур бактериальных клеток тестируемых и контрольных штаммов. Через 4 дня листовые диски заражали по отдельности 2 новорожденными особями соевой совки (SBL) (*Chrysodeixis includens*), кукурузной совки, (CEW) (*Helicoverpa zea*), гусеницы бархатных бобов (VBC) (*Anticarsia gemmatilis*) или травяной совки (*Spodoptera frugiperda*). Контрольные листовые диски получали с *Agrobacterium*, содержащими только вектор экспрессии с флуоресцентным маркером DsRed2 (Clontech™, 1290 Terra Bella Ave. Маунтин-Вью, Калифорния 94043). Листовые диски от не подвергнутых инфильтрации растений включали в качестве второго контроля. Поедание зеленых тканей листа оценивали через три дня после заражения и присваивали баллы от 0 до 9.

Пример 7. Опосредованная *Agrobacterium* трансформация маиса и регенерация трансгенных растений

Для трансформации маиса, опосредованной *Agrobacterium*, с помощью последовательности полинуклеотида согласно настоящему изобретению, можно применять способ Zhao (патент США № 5981840 и РСТ публикация патентной заявки WO98/32326; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки). Вкратце, незрелые зародыши выделяли из маиса и зародышей приводили в контакт с

суспензией *Agrobacterium* в условиях, при которых бактерии были способны переносить нуклеотидную последовательность токсина в по меньшей мере одну клетку по меньшей мере одного из незрелых зародышей (стадия 1: стадия инфицирования). На данной стадии незрелые зародыши можно погружать в суспензию *Agrobacterium* для инициации инокуляции. Зародыши в течение определенного времени культивировали совместно с *Agrobacterium* (стадия 2: стадия совместного культивирования). Незрелые зародыши можно культивировать на твердой среде после стадии инфицирования. После данного периода совместного культивирования предполагалась необязательная стадия "покоя". На данной стадии покоя зародыши инкубировали в присутствии по меньшей мере одного антибиотика, который, как известно, ингибирует рост *Agrobacterium*, без добавления средства для отбора растительных трансформантов (стадия 3: стадия покоя). Незрелые зародыши можно культивировать на твердой среде с антибиотиком, но без средства для отбора, для исключения *Agrobacterium* и в течение фазы покоя для инфицированных клеток. Затем инокулированные зародыши культивировали на среде, содержащей средство для отбора, и выделяли растущий трансформированный каллус (стадия 4: стадия отбора). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде со средством для отбора, что приводило к избирательному росту трансформированных клеток. Затем каллус регенерировали с получением растений (стадия 5: стадия регенерации), при этом каллусы, выращенные на селективной среде, можно культивировать на твердой среде для регенерации растений.

Пример 8. Трансформация зародышей сои

Зародыши сои подвергали бомбардировке плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность токсина, функционально связанную с подходящим промотором, как указано ниже. Для индукции соматических зародышей семядоли длиной 3-5 мм, иссеченные из поверхностно-стерилизованных незрелых семян соответствующего сорта сои, культивировали на свету или в темноте при 26°C на соответствующей агаровой среде в течение шести-десяти недель. Соматические зародыши, дающие вторичные зародыши, затем вырезали и помещали в подходящую жидкую среду. После повторного отбора в отношении кластеров соматических зародышей, которые размножали в виде зародышей на ранней стадии глобулы, суспензии поддерживали, как описано ниже.

Зародышевые суспензионные культуры сои можно поддерживать в 35 мл жидкой среды на ротационном шейкере при 150 об./мин. при 26°C с флуоресцентными источниками света согласно схеме день/ночь 16:8 часов. Культуры пересевали каждые две недели путем инокуляции примерно 35 мг ткани в 35 мл жидкой среды.

Зародышевые суспензионные культуры сои затем можно трансформировать посредством способа бомбардировки геной пушкой (Klein, et al., (1987) *Nature* (London) 327:70-73, патент США № 4945050). Для данных трансформаций можно применять устройство DuPont Biolistic PDS1000/HE (модернизированную для применения гелия).

Ген селективного маркера, который можно применять для облегчения трансформации сои, без ограничения включал следующее: промотор 35S из вируса

мозаики цветной капусты (Odell, et al., (1985) Nature 313:810-812), ген гигромицин-фосфотрансферазы из плазмиды pJR225 (из E. coli; Gritz, et al., (1983) Gene 25:179-188) и 3'-участок из гена нопалинсинтазы из Т-ДНК Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Кассету экспрессии, содержащую нуклеотидную последовательность токсина (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или последовательность, оптимизированную для маиса), функционально связанную с подходящим промотором, можно выделять в виде рестрикционного фрагмента. Данный фрагмент затем можно вставить в уникальный сайт рестрикции вектора, несущего маркерный ген.

К 50 мкл суспензии частиц золота размером 1 мкм с концентрацией 60 мг/мл добавляли (по порядку): 5 мкл ДНК (1 мкг/мкл), 20 мкл спермидина (0,1 М) и 50 мкл CaCl₂ (2,5 М). Препарат частиц затем перемешивали в течение трех минут, центрифугировали с применением микроцентрифуги в течение 10 секунд и удаляли супернатант. Частицы, покрытые ДНК, затем однократно промывали в 400 мкл 70% этанола и ресуспендировали в 40 мкл безводного этанола. Суспензию ДНК/частицы можно обрабатывать ультразвуком три раза, в каждом случае в течение одной секунды. Затем по пять микролитров частиц золота, покрытых ДНК, загружали на каждый диск-макроноситель.

Примерно 300-400 мг двухнедельной суспензионной культуры помещали в пустую чашку Петри размером 60×15 мм, и удаляли остаточную жидкость из ткани с помощью пипетки. В каждом эксперименте по трансформации обычно подвергали бомбардировке приблизительно 5-10 чашек с тканью. Давление разрыва мембраны устанавливали на 1100 фунтов на кв. дюйм, и в камере создавали вакуум с понижением давления до 28 дюймов ртутного столба. Ткань помещали на расстоянии примерно 3,5 дюйма от задерживающего экрана и подвергали бомбардировке три раза. После осуществления бомбардировки ткань можно разделить пополам, и поместить обратно в жидкость, и культивировать, как описано выше.

Через пять-семь дней после осуществления бомбардировки жидкую среду можно заменить свежей средой, а через одиннадцать-двенадцать дней после осуществления бомбардировки свежей средой, содержащей 50 мг/мл гигромицина. Эту селективную среду можно обновлять еженедельно. Через семь-восемь недель после осуществления бомбардировки можно наблюдать зеленую трансформированную ткань, растущую из нетрансформированных, некротических зародышевых кластеров. Выделенную зеленую ткань удаляли и инокулировали в отдельные колбы для получения посредством клонального размножения новых трансформированных зародышевых суспензионных культур. Каждую новую линию можно рассматривать в качестве независимого объекта трансформации. Данные суспензии затем можно пересевать и поддерживать в виде кластеров незрелых зародышей или регенерировать в целые растения путем обеспечения созревания и прорастивания отдельных соматических зародышей.

Пример 9. Получение вариантов Cry1B с улучшенным спектром инсектицидной активности

Ряд дополнительных вариантных полипептидов Cry1B, полученных из IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), конструировали для введения дополнительных аминокислотных замен в домен I или домен III, которые обнаружили в примере 4 (таблица 4), чтобы получить повышенную инсектицидную активность против кукурузной совки, дополнительно улучшить инсектицидную активность против кукурузной совки (CEW) по сравнению с IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41). Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности и кратность улучшения инсектицидной активности против кукурузной совки согласно IC50 для выбранных вариантов, имеющих аминокислотные замены в домене III, показаны в таблице 6.

Таблица 6

ID клона	Полипептидная последовательность	Кратность улучшения по сравнению с Cry1Bd
IP1B-B60	SEQ ID NO: 62	123
IP1B-B61	SEQ ID NO: 63	93
IP1B-B62	SEQ ID NO: 64	93
IP1B-B63	SEQ ID NO: 65	105
IP1B-B64	SEQ ID NO: 66	109
IP1B-B65	SEQ ID NO: 67	232
IP1B-B66	SEQ ID NO: 68	200
IP1B-B67	SEQ ID NO: 69	168
IP1B-B68	SEQ ID NO: 70	296
IP1B-B69	SEQ ID NO: 71	232
IP1B-B80	SEQ ID NO: 72	160
IP1B-B81	SEQ ID NO: 73	200
IP1B-B82	SEQ ID NO: 74	194
IP1B-B83	SEQ ID NO: 75	178
S59-01	SEQ ID NO: 79	81
S59-03	SEQ ID NO: 80	96
S59-04	SEQ ID NO: 81	96
S59-06	SEQ ID NO: 82	88
S59-07	SEQ ID NO: 83	82
S59-08	SEQ ID NO: 84	75
S59-09	SEQ ID NO: 85	82
S59-10	SEQ ID NO: 86	91
S62-12	SEQ ID NO: 87	120

S62-14	SEQ ID NO: 88	128
S62-16	SEQ ID NO: 89	136
S62-18	SEQ ID NO: 90	104
S62-21	SEQ ID NO: 91	128
S65-1	SEQ ID NO: 92	126
S65-12	SEQ ID NO: 93	119
S65-2	SEQ ID NO: 94	106
S65-3	SEQ ID NO: 95	105
S65-4	SEQ ID NO: 96	138
S65-6	SEQ ID NO: 97	143

Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности и кратность улучшения инсектицидной активности против кукурузной совки согласно IC50 для выбранных вариантов, имеющих аминокислотные замены в домене I, показаны в таблице 7.

Таблица 7

ID клона	Полипептидная последовательность	Кратность улучшения по сравнению с Cry1Bd
SL3-01	SEQ ID NO: 98	9
SL3-02	SEQ ID NO: 99	84
SL3-03	SEQ ID NO: 100	74
SL3-04	SEQ ID NO: 101	71
SL3-05	SEQ ID NO: 102	99
SL3-06	SEQ ID NO: 103	93
SL3-07	SEQ ID NO: 104	74
SL3-08	SEQ ID NO: 105	91
SL3-09	SEQ ID NO: 106	86
SL3-10	SEQ ID NO: 107	85
SL3-11	SEQ ID NO: 108	31
SL3-12	SEQ ID NO: 109	109
SL3-13	SEQ ID NO: 110	87
SL3-14	SEQ ID NO: 111	113
SL3-15	SEQ ID NO: 112	67
SL3-16	SEQ ID NO: 113	93
SL3-17	SEQ ID NO: 114	112
SL3-18	SEQ ID NO: 115	102

SL3-19	SEQ ID NO: 116	76
SL4-1	SEQ ID NO: 117	266
SL4-2	SEQ ID NO: 118	325
SL4-3	SEQ ID NO: 119	>320
SL4-5	SEQ ID NO: 120	>320
SL4-6	SEQ ID NO: 121	352
SL4-7	SEQ ID NO: 122	713
SL6-01	SEQ ID NO: 123	100
SL6-02	SEQ ID NO: 124	92
SL6-03	SEQ ID NO: 125	69
SL6-04	SEQ ID NO: 126	82
SL6-05	SEQ ID NO: 127	75
SL6-06	SEQ ID NO: 128	80
SL6-07	SEQ ID NO: 129	81
SL6-08	SEQ ID NO: 130	86
SL6-09	SEQ ID NO: 131	105
SL6-10	SEQ ID NO: 132	58
SL6-11	SEQ ID NO: 133	95
SL6-12	SEQ ID NO: 134	432
SL6-13	SEQ ID NO: 135	97
SL6-14	SEQ ID NO: 136	95
SL6-15	SEQ ID NO: 137	162
SL6-16	SEQ ID NO: 138	77
SL7-1	SEQ ID NO: 139	97
SL7-5	SEQ ID NO: 140	117
SL7-6	SEQ ID NO: 141	108
SL7-7	SEQ ID NO: 142	96
SL8-02	SEQ ID NO: 143	130
SL8-03	SEQ ID NO: 144	102

Инсектицидную активность вариантов Cry1B определяли, как описано в примере 4. Конкретные варианты, указанные в таблице 8, обладающие активностью, повышенной по меньшей мере в 2 раза (IC₅₀) по сравнению с активностью MP258 (SEQ ID NO: 47), отбирали для дополнительного анализа. Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности и аминокислотные замены по сравнению с IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41) показаны в таблице 8.

Таблица 8

ID клона	Полипептид	362	518	553	595	596	606	645	646
IP1B-B45	SEQ ID NO: 41	N	S	I	D	N	E	E	A
IP1B-B60	SEQ ID NO: 62	Y	L	I	D	N	E	E	A
IP1B-B61	SEQ ID NO: 63	N	L	R	D	N	E	E	A
IP1B-B62	SEQ ID NO: 64	N	L	I	D	N	E	L	A
IP1B-B63	SEQ ID NO: 65	N	L	I	D	N	E	T	A
IP1B-B64	SEQ ID NO: 66	N	L	I	D	N	E	E	H
IP1B-B65	SEQ ID NO: 67	Y	L	I	S	N	H	E	A
IP1B-B66	SEQ ID NO: 68	Y	L	I	S	N	Q	E	A
IP1B-B67	SEQ ID NO: 69	Y	L	I	S	T	H	E	A
IP1B-B68	SEQ ID NO: 70	Y	L	I	S	V	E	E	A
IP1B-B69	SEQ ID NO: 71	Y	L	I	S	V	Q	E	A
IP1B-B80	SEQ ID NO: 72	Y	L	I	D	T	Q	E	A
IP1B-B81	SEQ ID NO: 73	Y	L	I	D	V	H	E	A
IP1B-B82	SEQ ID NO: 74	N	L	R	D	T	H	E	A
IP1B-B83	SEQ ID NO: 75	N	L	R	D	V	H	E	A

Ряд вариантных полипептидов Cry1B, полученных из IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), конструировали для введения дополнительных аминокислотных замен в домен I, чтобы дополнительно улучшить инсектицидную активность против кукурузной совки (CEW) по сравнению с IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66). Вариантные полипептиды Cry1B, обладающие улучшенной инсектицидной активностью (кратность улучшения согласно IC50), которые были получены, включают указанные в таблице 9. Инсектицидную активность вариантов Cry1B определяли, как описано в примере 4, и результаты определения инсектицидной активности показаны в таблице 9. Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности и аминокислотные замены по сравнению с IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66) показаны в таблице 10.

Выравнивание аминокислотных последовательностей выбранных вариантных полипептидов Cry1B показано на фигуре 6.

Таблица 9

ID клона		Кратность улучшения по сравнению с Cry1Bd
IP1B-B100	SEQ ID NO: 76	149
IP1B-B101	SEQ ID NO: 77	179
IP1B-B102	SEQ ID NO: 78	169

Таблица 10

		112	114	210	245
IP1B-B64	SEQ ID NO: 66	I	M	S	T
IP1B-B100	SEQ ID NO: 76	L	Y	S	T
IP1B-B101	SEQ ID NO: 77	I	Y	R	T
IP1B-B102	SEQ ID NO: 78	I	Y	S	H

Выравнивание аминокислотных последовательностей выбранных вариантных полипептидов Cry1B показано на фигуре 6.

Значения процентной идентичности аминокислотной последовательности вариантных полипептидов Cry1B, указанных в таблице 8 и таблице 10, рассчитанные с применением алгоритма Нидлмана-Вунша, реализованного в программе Needle (набор инструментов EMBOSS), показаны в виде матричной таблицы в таблице 11.

Таблица 11

	IP1B-B45 SEQ ID NO: 45	IP1B-B100 SEQ ID NO: 76	IP1B-B101 SEQ ID NO: 77	IP1B-B102 SEQ ID NO: 76	IP1B-B103 SEQ ID NO: 62	IP1B-B104 SEQ ID NO: 63	IP1B-B105 SEQ ID NO: 64	IP1B-B106 SEQ ID NO: 65	IP1B-B107 SEQ ID NO: 66	IP1B-B108 SEQ ID NO: 67	IP1B-B109 SEQ ID NO: 68	IP1B-B110 SEQ ID NO: 69	IP1B-B111 SEQ ID NO: 70	IP1B-B112 SEQ ID NO: 71	IP1B-B113 SEQ ID NO: 72	IP1B-B114 SEQ ID NO: 73	IP1B-B115 SEQ ID NO: 74	IP1B-B116 SEQ ID NO: 75
IP1B-B45 SEQ ID NO: 45		99,4	99,4	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,4	99,4	99,2	99,4	99,2	99,4	99,4	99,4	99,4
IP1B-B100 SEQ ID NO: 76	-		99,7	99,7	99,4	99,4	99,4	99,4	99,7	99,1	99,1	98,9	99,1	98,9	99,1	99,1	99,1	99,1

	IP1 B- B1 01 SE Q ID NO : 77	ID NO: 76	ID NO: 77	ID NO: 76	NO: 62	NO: 63	NO: 64	NO: 65	NO: 66	NO: 67	NO: 68	NO: 69	NO: 70	NO: 71	NO: 72	NO: 73	NO: 74	NO: 75
		-	-	99 ,7	99 ,4	99 ,4	99 ,4	99, 4	99, 7	99, 1	99, 1	98, 9	99, 1	98, 9	99, 1	99, 1	99, 1	99, 1
	IP1 B- B1 02 SE Q ID NO : 78	-	-	-	99 ,4	99 ,4	99 ,4	99, 4	99, 7	99, 1	99, 1	98, 9	99, 1	98, 9	99, 1	99, 1	99, 1	99, 1
	IP1 B- B6 0 SE Q ID NO : 62	-	-	-	-	99 ,7	99 ,7	99, 7	99, 7	99, 7	99, 7	99, 5	99, 7	99, 5	99, 7	99, 7	99, 4	99, 4

	IP1 B- B6 1 SE Q ID NO : 63	ID NO: 76	ID NO: 77	ID NO: 76	NO: 62	NO: 63	NO: 64	NO: 65	NO: 66	NO: 67	NO: 68	NO: 69	NO: 70	NO: 71	NO: 72	NO: 73	NO: 74	NO: 75
		-	-	-	-	-	99,7	99,7	99,7	99,4	99,4	99,2	99,4	99,2	99,4	99,4	99,7	99,7
	IP1 B- B6 2 SE Q ID NO : 64	-	-	-	-	-	99,8	99,7	99,4	99,4	99,2	99,4	99,2	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
	IP1 B- B6 3 SE Q ID NO : 65	-	-	-	-	-	-	99,7	99,4	99,4	99,2	99,4	99,2	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4

	IP1 B- B6 4 SE Q ID NO : 66	ID NO: 76	ID NO: 77	ID NO: 76	NO: 62	NO: 63	NO: 64	NO: 65	NO: 66	NO: 67	NO: 68	NO: 69	NO: 70	NO: 71	NO: 72	NO: 73	NO: 74	NO: 75
		-	-	-	-	-	-	-	-	99, 4	99, 4	99, 2	99, 4	99, 2	99, 4	99, 4	99, 4	99, 4
	IP1 B- B6 5 SE Q ID NO : 67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99, 8	99, 8	99, 7	99, 7	99, 5	99, 7	99, 4	99, 4
	IP1 B- B6 6 SE Q ID NO : 68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99, 7	99, 7	99, 8	99, 7	99, 5	99, 2	99, 2

	ID NO: 76	ID NO: 77	ID NO: 76	NO: 62	NO: 63	NO: 64	NO: 65	NO: 66	NO: 67	NO: 68	NO: 69	NO: 70	NO: 71	NO: 72	NO: 73	NO: 74	NO: 75
IP1 B- B8 0 SE Q ID NO : 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99, 7	99, 5	99, 4
IP1 B- B8 1 SE Q ID NO : 73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99, 5	99, 7
IP1 B- B8 2 SE Q ID NO : 74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99, 8

Пример 10. Получение химерных форм на основе домена I MP258/Cry1Bd

Химерные формы на основе MP258/Cry1Bd конструировали с заменой домена I либо домена II Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) соответствующим доменом I либо доменом II

MP258 (SEQ ID NO: 47). Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности, соответствующие домен I, домен II и домен III и инсектицидная активность против кукурузной совки для полученных химерных форм показаны в таблице 12. Выравнивание последовательностей Cry1Bd (SEQ ID NO: 1), MP258 (SEQ ID NO: 47) и химерных форм на основе Cry1Bd/MP258, MO2-01 (SEQ ID NO: 145) и MO2-02 (SEQ ID NO: 146), показано на фигуре 7.

Таблица 12

Идентификационный номер	Домен I	Домен II	Домен III	IC50 (ppm)	LC50 (ppm)
MO2-1 (SEQ ID NO: 145)	Cry1Bd	MP258	MP258	37,6	н.о.
MO2-2 (SEQ ID NO: 146)	MP258	Cry1Bd	MP258	7,5	44,8

С учетом вышеприведенных результатов конструировали ряд дополнительных вариантов полипептидов Cry1B с введением альфа-спиралей домена I MP258 (SEQ ID NO: 47) в Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) или альфа-спиралей домена I Cry1Bd (SEQ ID NO: 1) в MP258 (SEQ ID NO: 47). Идентификационный номер клона, идентификационный номер последовательности и инсектицидная активность против кукурузной совки для выбранных вариантов, имеющих замены альфа-спиралей в домене I, показаны в таблице 13. Выравнивания аминокислотных последовательностей химерных полипептидов Cry1B показаны на фигурах 8 и 9.

Таблица 13

Идентификационный номер	Остов	α-спирали домена I MP258			α-спирали домена I Cry1Bd			IC50 (ppm)	LC50 (ppm)
		1	2	3	1	2	3		
MO4-02 (SEQ ID NO: 149)	Cry1Bd	✓							
MO4-03 (SEQ ID NO: 150)			✓						
MO4-05 (SEQ ID NO: 152)		✓	✓						
MO4-01 (SEQ ID NO: 147)		✓	✓	✓				9,1	568
MO4-06 (SEQ ID NO: 153)			✓	✓					
MO4-04 (SEQ ID NO: 151)				✓					
MO4-07 (SEQ ID NO: 154)		✓		✓					
MO5-02 (SEQ ID NO: 155)	MP258				✓				
MO5-03 (SEQ ID NO: 156)						✓			
MO5-05 (SEQ ID NO: 157)					✓	✓			

NO: 158)									
MO5-04 (SEQ ID NO: 157)							✓		
MO5-07 (SEQ ID NO: 160)				✓		✓			
MO5-01 (SEQ ID NO: 148)				✓	✓	✓	6,3	222	
MO5-06 (SEQ ID NO: 159)					✓	✓			

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, ориентированы на уровень специалиста в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Все публикации, патенты и заявки на патент включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент конкретно и отдельно была включена посредством ссылки.

Хотя в целях ясности понимания вышеприведенное изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера, на практике можно осуществлять определенные изменения и модификации в пределах объема вариантов осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. ДНК-конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и второй вариантный полипептид Cry1B, где каждый из первого и второго вариантных полипептидов Cry1B характеризуется инсектицидной активностью.

2. ДНК-конструкция по п. 1, где каждый из полинуклеотидов, кодирующих первый и второй вариантные полипептиды Cry1B, функционально связан с гетерологичным регуляторным элементом.

3. ДНК-конструкция по п. 1, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

4. ДНК-конструкция по п. 1, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B характеризуется отличающимся участком приложения действия, механизмом действия, или второй вариантный полипептид Cry1B характеризуется активностью в отношении насекомого, устойчивого к активности первого вариантного полипептида Cry1B.

5. ДНК-конструкция по п. 1, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под SEQ IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ

ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), и SL8-02 (SEQ ID NO: 144), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных в IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27) и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

6. ДНК-конструкция по п. 1, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67) и IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76) и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143) и SL8-02 (SEQ ID NO: 144).

7. Трансгенное растение, содержащее молекулярный "пакет", содержащий полинуклеотид, кодирующий один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и второй вариантный полипептид Cry1B, где каждый из первого и второго вариантных полипептидов Cry1B характеризуется инсектицидной активностью.

8. Трансгенное растение по п. 7, где каждый из полинуклеотидов, кодирующих первый и второй вариантные полипептиды Cry1B, функционально связан с гетерологичным регуляторным элементом.

9. Трансгенное растение по п. 7, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83

(SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

10. Трансгенное растение по п. 7, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B характеризуется отличающимся участком приложения действия, механизмом действия, или второй вариантный полипептид Cry1B характеризуется активностью в отношении насекомого, устойчивого к активности первого вариантного полипептида Cry1B.

11. Трансгенное растение по п. 7, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под SEQ IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69), , IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), и SL8-02 (SEQ ID NO: 144), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27) и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

12. Трансгенное растение по п. 7, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67) и IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76) и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143) и SL8-02 (SEQ ID NO: 144).

13. Трансгенное растение, содержащее "пакет", полученный в результате скрещивания, предусматривающий полинуклеотид, кодирующий один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и

второй вариантный полипептид Cry1B, где каждый из первого и второго вариантных полипептидов Cry1B характеризуется инсектицидной активностью.

14. Трансгенное растение по п. 5, где каждый из полинуклеотидов, кодирующих первый и второй вариантные полипептиды Cry1B, функционально связан с гетерологичным регуляторным элементом.

15. Трансгенное растение по п. 13, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), SL8-02 (SEQ ID NO: 144), IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27), и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

16. Трансгенное растение по п. 13, где каждый из первого вариантного полипептида Cry1B и отличающегося второго вариантного полипептида Cry1B характеризуется отличающимся участком приложения действия, механизмом действия, или второй вариантный полипептид Cry1B характеризуется активностью в отношении насекомого, устойчивого к активности первого вариантного полипептида Cry1B.

17. Трансгенное растение по п. 13, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под SEQ IP1B-B21 (SEQ ID NO: 5), IP1B-B22 (SEQ ID NO: 7), IP1B-B23 (SEQ ID NO: 9), IP1B-B24 (SEQ ID NO: 11), IP1B-B25 (SEQ ID NO: 13), IP1B-B26 (SEQ ID NO: 15), IP1B-B27 (SEQ ID NO: 17), IP1B-B28 (SEQ ID NO: 19), IP1B-B29 (SEQ ID NO: 21), IP1B-B40 (SEQ ID NO: 31), IP1B-B41 (SEQ ID NO: 33), IP1B-B42 (SEQ ID NO: 35), IP1B-B43 (SEQ ID NO: 37), IP1B-B44 (SEQ ID NO: 39), IP1B-B45 (SEQ ID NO: 41), IP1B-B46 (SEQ ID NO: 43), IP1B-B47 (SEQ ID NO: 45), IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67), IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), IP1B-B67 (SEQ ID NO: 69),), IP1B-B68 (SEQ ID NO: 70), IP1B-B69 (SEQ ID NO: 71), IP1B-B80 (SEQ ID NO: 72), IP1B-B81 (SEQ ID NO: 73), IP1B-B82 (SEQ ID NO: 74), IP1B-B83 (SEQ ID NO: 75), IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76), и IP1B-B101 (SEQ ID NO:

77), и IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143), и SL8-02 (SEQ ID NO: 144), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B31 (SEQ ID NO: 23), IP1B-B32 (SEQ ID NO: 25), IP1B-B33 (SEQ ID NO: 27) и IP1B-B34 (SEQ ID NO: 29).

18. Трансгенное растение по п. 13, где первый вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B60 (SEQ ID NO: 62), IP1B-B61 (SEQ ID NO: 63), IP1B-B62 (SEQ ID NO: 64), IP1B-B63 (SEQ ID NO: 65), IP1B-B64 (SEQ ID NO: 66), IP1B-B65 (SEQ ID NO: 67) и IP1B-B66 (SEQ ID NO: 68), и где второй вариантный полипептид Cry1B содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с одной из последовательностей, представленных под IP1B-B100 (SEQ ID NO: 76) и IP1B-B101 (SEQ ID NO: 77), IP1B-B102 (SEQ ID NO: 78), SL8-01 (SEQ ID NO: 143) и SL8-02 (SEQ ID NO: 144).

19. Трансгенное растение или его потомок, содержащие ДНК-конструкцию по п. 1, где указанное трансгенное растение представляет собой кукурузу или сою.

20. Трансгенное растение или его потомок, содержащие молекулярный "пакет" по п. 7, где указанное трансгенное растение представляет собой кукурузу или сою.

21. Трансгенное растение или его потомок, содержащие "пакет", полученный в результате скрещивания, по п. 13, где указанное трансгенное растение представляет собой кукурузу или сою.

22. Композиция, содержащая полинуклеотид, кодирующий один вариантный полипептид Cry1B, вместе со вторым полинуклеотидом, кодирующим отличающийся второй вариантный полипептид Cry1B, где первый вариантный полипептид Cry1B и второй вариантный полипептид Cry1B, где каждый из первого и второго вариантных полипептидов Cry1B характеризуется инсектицидной активностью.

23. Способ контроля популяции насекомого-вредителя, включающий приведение в контакт популяции насекомого-вредителя с трансгенным растением по любому из пп. 7-21 или композицией по п. 22.

По доверенности

1/38

Фиг. 1А

	1	50
Cry1Bd	(1) M 1 SNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B1	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCVAE V NNID P F	
MP258	(1) M 1 SNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLS P DARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B21	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B22	(1) MPSNRKNENEI G IINALSIPAVSNHSAQMDLS P DARIEDSLCVAE V NNID P F	
IP1B-B23	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLS P DARIEDSLCVAE V NNID P F	
IP1B-B24	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B25	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B26	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B27	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B28	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B29	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B40	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B41	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B42	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B43	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B44	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B45	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B46	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B47	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL	
IP1B-B31	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCVAE V NNID P F	
IP1B-B32	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCVAE V NNID P F	
IP1B-B33	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCVAE V NNID P F	
IP1B-B34	(1) MPSNRKNENEIIN-----AVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCVAE V NNID P F	
GS060	(1) MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLS P DARIEDSLCVAE V NNID P F	
	51	100
Cry1Bd	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B1	(46) VSASTVQTGIS I AGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
MP258	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B21	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B22	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B23	(46) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B24	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B25	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B26	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B27	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B28	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B29	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B40	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B41	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B42	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B43	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B44	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B45	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B46	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B47	(51) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B31	(46) VSASTVQTGIS I AGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B32	(46) VSASTVQTGIS I AGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B33	(46) VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
IP1B-B34	(46) VSASTVQTGIS I AGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	
GS060	(51) VSASTVQTGIS I AGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF I VGELWPSSGRDPWEIF	

Фиг. 1В

		101		150
Cry1Bd	(101)	LEHVEQLIRQQVTENTRNTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
IP1B-B1	(96)	MEHVEQIVRQQITDSVRDTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
MP258	(101)	LEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDDART
IP1B-B21	(101)	MEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B22	(101)	LEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDDART
IP1B-B23	(96)	MEHVEQIVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDDART
IP1B-B24	(101)	MEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B25	(101)	MEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B26	(101)	MEHVEQLVRQQITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B27	(101)	MEHVEQLVRQAITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B28	(101)	MEHVEQLVRQAITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B29	(101)	MEHVEQLVRQAITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B40	(101)	MEHVEQLVRQHITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B41	(101)	MEHVEQLVRQHITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B42	(101)	MEHVEQLVRQMITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B43	(101)	MEHVEQLVRQMITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B44	(101)	MEHVEQLVRQMITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B45	(101)	MEHVEQLVRQHITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B46	(101)	MEHVEQLVRQMITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B47	(101)	MEHVEQLVRQHITENARNTA	LARLQGLGASFRAYQQSLEDW	LENRDNART
IP1B-B31	(96)	MEHVEQIVRQQITDSVRDTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
IP1B-B32	(96)	MEHVEQIVRQQITDSVRDTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
IP1B-B33	(96)	MEHVEQIVRQQITDSVRDTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
IP1B-B34	(96)	LEHVEQLIRQQVTENTRNTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
GS060	(101)	MEHVEQIVRQQITDSVRDTA	IARLEGLGRGYRSYQQALETWL	DNRNDRS
		151		200
Cry1Bd	(151)	RSIIILERYVALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B1	(146)	RSIIIRERYIALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
MP258	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B21	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B22	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B23	(146)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B24	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B25	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B26	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B27	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B28	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B29	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B40	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B41	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B42	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B43	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B44	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B45	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B46	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B47	(151)	RSVLTYQYIALELDFLNAMP	LFAINNQV	PLLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B31	(146)	RSIIIRERYIALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B32	(146)	RSIIIRERYIALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B33	(146)	RSIIILERYIALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
IP1B-B34	(146)	RSIIILERYVALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS
GS060	(151)	RSIIIRERYIALELDITTAI	PLFSIRNQEVP	LLMVYAQAANLHLLLLLRDAS

Фиг. 1С

		201		250
Cry1Bd	(201)	LFGSEFGMASSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B1	(196)	LFGSEFGMSSSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
MP258	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B21	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B22	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B23	(196)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B24	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B25	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B26	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B27	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B28	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B29	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B40	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B41	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B42	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B43	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B44	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B45	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B46	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B47	(201)	LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B31	(196)	LFGSEFGMSSSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B32	(196)	LFGSEFGMSSSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B33	(196)	LFGSEFGMASSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
IP1B-B34	(196)	LFGSEFGMSADVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
GS060	(201)	LFGSEFGMSADVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW		
		251		300
Cry1Bd	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B1	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRVYPMNTSAQLTREIYTDPIGRTN		
MP258	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B21	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B22	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRVYPMNTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B23	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B24	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B25	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B26	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B27	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B28	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B29	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B40	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B41	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B42	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B43	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B44	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B45	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B46	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B47	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B31	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRVYPMNTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B32	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B33	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
IP1B-B34	(246)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		
GS060	(251)	LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN		

Фиг. 1D

		301	350
Cry1Bd	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B1	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
MP258	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B21	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B22	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B23	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B24	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B25	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B26	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B27	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B28	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B29	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B40	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B41	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B42	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B43	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B44	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B45	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B46	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B47	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B31	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B32	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B33	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
IP1B-B34	(296)	APSGFASTNWFNNNAPSFS	IAEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
GS060	(301)	GPN--NS--WFRN--GASFS	IAENAIROPHLYDFLTNLTIIYRRS--QVGT
		351	400
Cry1Bd	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTOGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B1	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
MP258	(351)	QYMNYWVGHRLLSRIGSLTSTHG	TN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B21	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B22	(351)	QHMNYWVGHRLESSTIRGSLSTSTHG	TN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B23	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B24	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B25	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B26	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B27	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B28	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B29	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B40	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B41	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B42	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B43	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B44	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B45	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B46	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B47	(351)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTHGATN-TSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B31	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTOGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B32	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTOGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B33	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTOGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES
IP1B-B34	(346)	QHMNYWVGHRNLNFRP	IGGTLNTSTOGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES
GS060	(345)	TIMNLWAGHRITENRI	OGGSTSEMVCITNPMVSVDHPTVNRDVYRTES

Фиг. 1Е

		401		450
Cry1Bd	(401)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
IP1B-B1	(395)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
MP258	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B21	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B22	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B23	(395)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B24	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B25	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B26	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B27	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B28	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B29	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B40	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B41	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B42	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B43	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B44	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B45	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B46	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B47	(400)	YAGINILLTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-GSLLYTIGYTGVTQLFDS		
IP1B-B31	(396)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
IP1B-B32	(396)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
IP1B-B33	(396)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
IP1B-B34	(396)	NAGTNILETTPVNGVPWARFNEINPONIYERGATTYSOPYOGVGIQLFDS		
GS060	(395)	LAGGLGSLSGIRYGETRVDFDMIFRNHPDIVTGLFYHPCGAGTATOVKDS		
		451		500
Cry1Bd	(451)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B1	(445)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
MP258	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIISGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B21	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B22	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B23	(444)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIISGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B24	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B25	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B26	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIISNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B27	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIISGTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B28	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B29	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B40	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIISNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B41	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B42	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B43	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B44	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B45	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B46	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B47	(449)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI		
IP1B-B31	(446)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSATLTNTI		
IP1B-B32	(446)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSATLTNTI		
IP1B-B33	(446)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSATLTNTI		
IP1B-B34	(446)	ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSATLTNTI		
GS060	(445)	ETELPPETTEPNYRAEASHLSHSIGPTTQDVPPVYSWTHRSADRTNTI		

Фиг. 1F

		501		550
Cry1Bd	(501)	CPNRITQIPAVKGRFLFNG-SVISGPGFTGGDVVRLNRRNNGNIQNRGYIE		
IP1B-B1	(495)	CPNRITQIPAVKGRFLFNG-SVISGPGFTGGDVVRLNRRNNGNIQNRGYIE		
MP258	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B21	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B22	(499)	CPNRITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B23	(494)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B24	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B25	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B26	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B27	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B28	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B29	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B40	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B41	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B42	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B43	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B44	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B45	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B46	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B47	(499)	ATNIITQIPAVKGNFLFNG-SVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIE		
IP1B-B31	(496)	DPERINQIPLVKGRVVGGSVITGPGFTGGDILRRNTFGDFVSLQVNNIN		
IP1B-B32	(496)	DPERINQIPLVKGRVVGGSVITGPGFTGGDILRRNTFGDFVSLQVNNIN		
IP1B-B33	(496)	DPERINQIPLVKGRVVGGSVITGPGFTGGDILRRNTFGDFVSLQVNNIN		
IP1B-B34	(496)	DPERINQIPLVKGRVVGGSVITGPGFTGGDILRRNTFGDFVSLQVNNIN		
GS060	(495)	NSDRITQIPLVKAHTLOSGETTVVKGPGFTGGDILRRTSGGPFASFVNIN		
		551		600
Cry1Bd	(550)	VPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTSIELNVNLGNSS-----IFTNTLPAT		
IP1B-B1	(544)	VPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTSIELNVNLGNSS-----IFTNTLPAT		
MP258	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B21	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B22	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B23	(543)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B24	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSN-----IFSRIVPAT		
IP1B-B25	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B26	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B27	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B28	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B29	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B40	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B41	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSTIVPAT		
IP1B-B42	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B43	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B44	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B45	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B46	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B47	(548)	VPIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSN-----IFSSIVPAT		
IP1B-B31	(546)	SPIT-----QRYRLRFERYASSRDARIVLTGAASSTGVGGQVSVNMPLOKT		
IP1B-B32	(546)	SPIT-----QRYRLRFERYASSRDARIVLTGAASSTGVGGQVSVNMPLOKT		
IP1B-B33	(546)	SPIT-----QRYRLRFERYASSRDARIVLTGAASSTGVGGQVSVNMPLOKT		
IP1B-B34	(546)	SPIT-----QRYRLRFERYASSRDARIVLTGAASSTGVGGQVSVNMPLOKT		
GS060	(545)	FNIS-----QRYRARIRYASTNRIYVTVAGER-----IFAGQFDKT		

Фиг. 1G

		601		650
Cry1Bd	(593)	AASLDNLQSGDFGYVEINNAFTS	---ATGNIVGARN	-----FSANAEV
IP1B-B1	(587)	AASLDNLQSGDFGYVEINNAFTS	---ATGNIVGARN	-----FSANAEV
MP258	(591)	ATSLDNLQSRDFGYFESTNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B21	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESTNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B22	(591)	ATSLDNLQSRDFGYFESTNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B23	(586)	ATSLDNLQSRDFGYFESTNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B24	(591)	AVSLDNLQSRNFGYFESTNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B25	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B26	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B27	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B28	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B29	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B40	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B41	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B42	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B43	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B44	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B45	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B46	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B47	(591)	ATSLDNLQSRNFGYFESRNAFTS	---ATGNVVGVRN	-----FSENAGV
IP1B-B31	(591)	MEIGENLTSRTFRYTDFSNPFSFR	--ANPDIIIGISEQPLFGAGSISSGEL	
IP1B-B32	(591)	MEIGENLTSRTFRYTDFSNPFSFR	--ANPDIIIGISEQPLFGAGSISSGEL	
IP1B-B33	(591)	MEIGENLTSRTFRYTDFSNPFSFR	--ANPDIIIGISEQPLFGAGSISSGEL	
IP1B-B34	(591)	MEIGENLTSRTFRYTDFSNPFSFR	--ANPDIIIGISEQPLFGAGSISSGEL	
GS060	(583)	MDAGAPLTFQSF SYATINTATFEPERS	SSLTVGADT	-----FSSGNEV
		651		675
Cry1Bd	(633)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQK		
IP1B-B1	(627)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQK		
MP258	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B21	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B22	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B23	(626)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B24	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B25	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B26	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B27	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B28	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B29	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B40	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B41	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B42	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B43	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B44	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B45	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B46	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B47	(631)	IIDRFEFIPVTATFEAEYDLERAQE		
IP1B-B31	(639)	YIDKIEIILADATFEAESDLERAQK		
IP1B-B32	(639)	YIDKIEIILADATFEAESDLEQARK		
IP1B-B33	(639)	YIDKIEIILADATFEAESDLEQARK		
IP1B-B34	(639)	YIDKIEIILADATFEAESDLERAQK		
GS060	(626)	YIDRFELIPVTATFEAESDLERARK		

Фиг. 2А

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu
Ser

1 5 10 15

*

Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Ala Gln Met Asp Leu Ser Pro
Asp

20 25 30

**

Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Ile Ala Glu Gly Asn Asn Ile
Asn

35 40 45
*****#####
#

Pro Leu Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala
Gly

50 55 60

#

Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala
Ser

65 70 75 80

#

Phe Tyr Ser Phe Ile Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp
Pro

85 90 95

#

Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Val Arg Gln Gln
Ile

100 105 110

#

Фиг. 2А (продолжение)

Thr Glu Asn Ala Arg Asn Thr Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu
Gly

115

120

125

#

Ala Ser Phe Arg Ala Tyr Gln Gln Ser Leu Glu Asp Trp Leu Glu
Asn

130

135

140

#

Фиг. 2В

Arg Asp Asp Ala Arg Thr Arg Ser Val Leu Tyr Thr Gln Tyr Ile

Ala

145

150

155

160

#

Leu Glu Leu Asp Phe Leu Asn Ala Met Pro Leu Phe Ala Ile Asn

Asn

165

170

175

#

Gln Gln Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu

His

180

185

190

#

Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Phe Gly

Leu

195

200

205

#

Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Glu Arg Gln Ala Glu Lys

Thr

210

215

220

#

Arg Glu Tyr Ser Asp Tyr Cys Ala Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu

Asn

225

230

235

240

#

Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Leu Arg Tyr Asn Gln

Phe

245

250

255

Фиг. 2В (продолжение)

```
#####
#
```

Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe
Pro

270

```
#####
#
```

Ser Tyr Asp Thr Arg Ile Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu
Thr

285

[illegible]

Фиг. 2С

Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Gly Arg Thr Asn Ala Pro Ser
Gly

290

295

300

&

Phe Ala Ser Thr Asn Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser
Ala

305

310

315

320

&

Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro
Glu

325

330

335

&

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

340

345

350

&

Met Asn Tyr Trp Val Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Thr Ile Arg
Gly

355

360

365

&

Ser Leu Ser Thr Ser Thr His Gly Asn Thr Asn Thr Ser Ile Asn
Pro

370

375

380

&

Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Val Tyr Arg Thr Glu Ser
Tyr

385

390

395

400

Фиг. 2С (продолжение)

&

Ala Gly Ile Asn Ile Leu Leu Thr Thr Pro Val Asn Gly Val Pro
Trp

405

410

415

&

Ala Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser
Leu

420

425

430

&

Фиг. 2D

Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Phe Asp
Ser

435

440

445

&

Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu
Ser

450

455

460

&

Tyr Ser His Arg Leu Ser Asn Ile Arg Leu Ile Ser Gly Asn Thr
Leu

465

470

475

480

&

Arg Ala Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr
Asn

485

490

495

#####!!!!!!!
!

Thr Ile Ala Thr Asn Ile Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly
Asn

500

505

510

!!
!

Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly
Gly

515

520

525

!!
!

Asp Leu Val Arg Leu Asn Asn Ser Gly Asn Asn Ile Gln Asn Arg
Gly

530

535

540

Фиг. 2D (продолжение)

[illegible]

Tyr Leu Glu Val Pro Ile Gln Phe Ile Ser Thr Ser Thr Arg Tyr

Arg

545

550

555

560

.....

●

Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Pro Ile Gln Leu Ser Val

Asn

565

570

575

[illegible]

—

Фиг. 2Е

[illegible][illegible][illegible][illegible]

Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Glu
645 650 655

|||||

Фиг. 3

1

50

Дом. I Cry1Be (1)

IEDSLCIAEGNNIDPEVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQIASFYSF

Дом. I MP258 (1)

IEDSLCIAEGNNINPEVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQIASFYSF

51

100

Дом. I Cry1Be (51)

LVGELWPRGRDPWEIFLEHVEQLIRQQVTENTRDTALARLQGLGNSFRAY

Дом. I MP258 (51)

LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVRQQITENARNTALARLQGLGASFRAY

101

150

Дом. I Cry1Be (101)

QQSLEDWLENRDDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVPLLMV

Дом. I MP258 (101)

QQSLEDWLENRDDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMV

151

200

Дом. I Cry1Be (151)

YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQVEKTREYSDYCARW

Дом. I MP258 (151)

YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARW

201

Дом. I Cry1Be (201)

YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYD

Дом. I MP258 (201)

YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYD

251

Фиг. 4

	1	50
D3 Cry1Ah	(1)	NNIIASDSITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNSSGNNIQNR
D3 Cry1Bd	(1)	RTNTIGPNRITQIPAVKGRFLFNGSVISGPGFTGGDVRLNRNNGNIQNR
D3 Cry1Bh	(1)	RTNTIGPNRITQIPAVKGRFLFNGSVISGPGFTGGDVRLNRNNGNIQNR
D3 Cry1Bi	(1)	RTNTIGPNRITQIPAVKGNLLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNR
D3 MP258	(1)	RTNTIATNIITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNR
	51	100
D3 Cry1Ah	(50)	GYIEVPIHFFSTSTRYRVRVRYASVTP IHLNVNWGNSSIFSNTVPATATS
D3 Cry1Bd	(51)	GYIEVPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTSIELNVNLGNSSIFTNTLPATAAS
D3 Cry1Bh	(51)	GYIEVPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTSIELNVNWGNSSIFTNTLPATAAS
D3 Cry1Bi	(51)	GYIEVPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTP IHLNVNWGNSSIFSSTVPATAAS
D3 MP258	(51)	GYIEVPIQFTSTSTRYRVRVRYASVTP IQLSVNWGNSSIFSSTVPATATS
	101	150
D3 Cry1Ah	(100)	LDNLQSSDFGYFESANAFTSSLGNIVGVRNFSGTAGVIIDRFEFIPVTAT
D3 Cry1Bd	(101)	LDNLQSGDFGYVEINNAFTSATGNIVGARNFSANAEVIIDRFEFIPVTAT
D3 Cry1Bh	(101)	LDNLQSGDFGYVEINNAFTSATGNIVGVRNFSANAEVIIDRFEFIPVTAT
D3 Cry1Bi	(101)	LDNLQSRDFGYFESTNAFTSVTGNVVGVRNFSENARVIIDRFEFIPVTAT
D3 MP258	(101)	LDNLQSRDFGYFESTNAFTSATGNVVGVRNFSENAGVIIDRFEFIPVTAT
	151	162
D3 Cry1Ah	(150)	LEAEYNLERAQK
D3 Cry1Bd	(151)	FEAEYDLERAQK
D3 Cry1Bh	(151)	FEAEYDLERAQK
D3 Cry1Bi	(151)	FEAEYDLERAQE
D3 MP258	(151)	FEAEYDLERAQE

Фиг. 5А

1

50

D1 и 2 MP258 (1)
 IEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Be (1)
 IEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bi (1)
 IEDGLCIAEGEYIDPFVSASTVQTGISIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bg (1)
 IEDGLCIAEGEYIDPFVSASTVQTGISIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bf (1)
 IEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Ba (1)
 IEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bh (1)
 IEDSLCVAEVNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bd (1)
 IEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bb (1)
 IEDSLCVAEVNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF
 D1 и 2 Cry1Bc (1)
 IEDSLCVAEVNNIDPFVSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSF

51

100

D1 и 2 MP258 (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQITENARNTALARLOGLGASFRAY
 D1 и 2 Cry1Be (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQITENARNTALARLOGLGNSFRAY
 D1 и 2 Cry1Bi (51)
 LVGELWPKGRDQWEIFMEHVEQLVROQITANARNTALARLOGLGDSFRAY
 D1 и 2 Cry1Bg (51)
 LVGELWPKGRDQWEIFMEHVEQLVROQITANARNTALARLOGLGDSFRAY
 D1 и 2 Cry1Bf (51)
 LVGELWPSGRDQWEIFLEHVEQLINQOQITENARNTALARLOGLGDSFRAY
 D1 и 2 Cry1Ba (51)
 LVGELWPSGRDQWEIFLEHVEQLINQOQITENARNTALARLOGLGDSFRAY
 D1 и 2 Cry1Bh (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQVTEINTRNTALARLEGLGRGYRSY
 D1 и 2 Cry1Bd (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQVTEINTRNTALARLEGLGRGYRSY
 D1 и 2 Cry1Bb (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQVTEINTRNTALARLEGLGRGYRSY
 D1 и 2 Cry1Bc (51)
 LVGELWPSGRDPWEIFLEHVEQLVROQVTEINTRNTALARLEGLGRGYRSY

101

150

D1 и 2 MP258 (101)
 QQSLEDWLENRDDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Be (101)
 QQSLEDWLENRDDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVPLLMV

Фиг. 5А (продолжение)

D1 и 2 Cry1Bi (101)
 QQSLEDWLENRNDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIREQEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bg (101)
 QQSLEDWLENRNDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIREQEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bf (101)
 QQSLEDWLENRNDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Ba (101)
 QQSLEDWLENRNDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bh (101)
 QQALETWLDNRNDARSRSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNQEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bd (101)
 QQALETWLDNRNDARSRSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bb (101)
 QQALETWLDNRNDARSRSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMV
 D1 и 2 Cry1Bc (101)
 QQALETWLDNRNDARSRSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMV

151

200

D1 и 2 MP258 (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARW
 D1 и 2 Cry1Be (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQVEKTREYSDYCARW
 D1 и 2 Cry1Bi (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLYGREFGLTSQEIQRYYERQVERTRDYS DHCVQW
 D1 и 2 Cry1Bg (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLYGREFGLTSQEIQRYYERQVERTRDYS DHCVQW
 D1 и 2 Cry1Bf (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQVEQTRDYS DYCVIEW
 D1 и 2 Cry1Ba (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYYERQVERTRDYS DYCVIEW
 D1 и 2 Cry1Bh (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEWGTASSDVNQYYEQIIRYTEEYSNHC VQW
 D1 и 2 Cry1Bd (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEWGTASSDVNQYYEQIIRYTEEYSNHC VQW
 D1 и 2 Cry1Bb (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEWGTASSDVNQYYEQIIRYTEEYSNHC VQW
 D1 и 2 Cry1Bc (151)
 YAQAANLHLLLLRDASLFGSEWGTASSDVNQYYEQIIRYTEEYSNHC VQW

Фиг. 5В

201

250

D1 и 2 MP258 (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Be (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bi (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bg (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bf (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Ba (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bh (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bd (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bb (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS
 D1 и 2 Cry1Bc (201)
 YNTGLNNLRGTNAESWLRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTS

251

300

D1 и 2 MP258 (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Be (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bi (251) AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 MASMNWNWNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bg (251) AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 MASMNWNWNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bf (251) AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 MASMNWNWNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Ba (251) AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 MASMNWNWNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bh (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bd (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bb (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF
 D1 и 2 Cry1Bc (251)
 AQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDF

301

350

D1 и 2 MP258 (301) PEQLTIFSVLSRWSNTQYMNWVGHRLSRTIRGSLSTSTHGNTN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Be (301) PEQLTIFSVLSRWSNTQYMNWVGHRLSRTIRGSLSTSTHGNTN-
 TSIN

Фиг. 5В (продолжение)

D1 и 2 Cry1Bi (299) LEQLKIFSASSRWSNTRHMTYWRGHTIQSRPIRGALITSTHGNTN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Bg (299) LEQLKIFSASSRWSNTRHMTYWRGHTIQSRPIRGALITSTHGNTN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Bf (299) LEQLTIFSTSSRWSATRHMTYWRGHTIQSRPIGGGLNTSTHGSTN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Ba (299) LEQLTIFSASSRWSNTRHMTYWRGHTIQSRPIGGGLNTSTHGATN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Bh (301) PEQLTIYSTLSRWSNTQFMNIWAGHRLESRPIAGSLNTSTOGSTN-
 TSIN
 D1 и 2 Cry1Bd (301)
 PEQLTIYSASSRWSSTQHMNYWVGHRNLNFRPIGGTLNTSTOGLTNNTSIN
 D1 и 2 Cry1Bb (301)
 PEQLTIYSASSRWSSTQHMNYWVGHRNLNFRPIGGTLNTSTOGLTNNTSIN
 D1 и 2 Cry1Bc (301)
 PEQLTIYSASSRWSSTQHMNYWVGHRNLNFRPIGGTLNTSTOGLTNNTSIN

351

400

D1 и 2 MP258 (350) PVTLOFTSRDVYRTESYAGINIL--
 LITPVNGVPWARFNWRNPINSLR-G
 D1 и 2 Cry1Be (350) PVTLOFTSRDVYRTESYAGINIL--
 LITPVNGVPWARFNWRNPINSLR-G
 D1 и 2 Cry1Bi (348)
 PVTFQFFSRDVYRTESYAGVLLWGIYLEPIHGVPVTRFNFRNPQNTFERG
 D1 и 2 Cry1Bg (348)
 PVTFQFFSRDVYRTESYAGVLLWGIYLEPIHGVPVTRFNFRNPQNTFERG
 D1 и 2 Cry1Bf (348)
 PVRLSFFSRDVYRTESYAGVLLWGIYLEPIHGVPVTRFNFRNPQNTFERG
 D1 и 2 Cry1Ba (348)
 PVTLRFAASRDVYRTESYAGVLLWGIYLEPIHGVPVTRFNFTNPQNISDRG
 D1 и 2 Cry1Bh (350) PVTLOFTSRDIYRTESLAGLNIE--
 ITQPVNGVPWVRFNWRNPINSLR-G
 D1 и 2 Cry1Bd (351) PVTLOFTSRDVYRTESNAGTNIL--
 FTTPVNGVPWARFNFINPQNIYERG
 D1 и 2 Cry1Bb (351) PVTLOFTSRDVYRTESNAGTNIL--
 FTTPVNGVPWARFNFINPQNIYERG
 D1 и 2 Cry1Bc (351) PVTLOFTSRDVYRTESNAGTNIL--
 FTTPVNGVPWARFNFINPQNIYERG

Фиг. 5С

401

450

D1 и 2 MP258 (397)
 SLLYTIGYTGVTQLFDSETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLISGNTL
 D1 и 2 Cry1Be (397)
 SLLYTIGYTGVTQLFDSETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLISGNTL
 D1 и 2 Cry1Bi (398)
 TANYSQPYESPGLQLKDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGIILQTRL
 D1 и 2 Cry1Bg (398)
 TANYSQPYESPGLQLKDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGIILQTRL
 D1 и 2 Cry1Bf (398)
 TANYSQPYESPGLQLKDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLISQSRV
 D1 и 2 Cry1Ba (398)
 TANYSQPYESPGLQLKDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGIILQSRV
 D1 и 2 Cry1Bh (397)
 SLLYTIGYTGVTQLQDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLISSHV
 D1 и 2 Cry1Bd (399)
 ATTYSQPYQGVGIQLFDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTL
 D1 и 2 Cry1Bb (399)
 ATTYSQPYQGVGIQLFDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTL
 D1 и 2 Cry1Bc (399)
 ATTYSQPYQGVGIQLFDSETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTL

451

464

D1 и 2 MP258	(447)	RAPVYSWTHRSAD-
D1 и 2 Cry1Be	(447)	RAPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bi	(448)	NVPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bg	(448)	NVPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bf	(448)	HVPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Ba	(448)	NVPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bh	(447)	RALVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bd	(449)	RAPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bb	(449)	RAPVYSWTHRSADR
D1 и 2 Cry1Bc	(449)	RAPVYSWTHRSADR

Фиг. 6А

	1	50
IP1B-B100	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B101	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B102	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B64	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B62	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B63	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B61	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B82	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B83	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B60	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B81	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B65	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B66	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B67	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B68	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B69	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL
IP1B-B80	(1)	MPSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL

	51	100
IP1B-B100	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B101	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B102	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B64	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B62	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B63	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B61	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B82	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B83	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B60	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B81	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B65	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B66	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B67	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B68	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B69	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF
IP1B-B80	(51)	VSASTVQGTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSGRDPWEIF

Фиг. 6В

	101	150
IP1B-B100	(101)	MEHVEQLVRQHITYNARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B101	(101)	MEHVEQLVRQHITYNARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B102	(101)	MEHVEQLVRQHITYNARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B64	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B62	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B63	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B61	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B82	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B83	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B60	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B81	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B65	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B66	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B67	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B68	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B69	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART
IP1B-B80	(101)	MEHVEQLVRQHITMNAARNTALARLQGLGASFRAYQOSLEDWLENRDNART

	151	200
IP1B-B100	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B101	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B102	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B64	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B62	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B63	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B61	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B82	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B83	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B60	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B81	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B65	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B66	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B67	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B68	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B69	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS
IP1B-B80	(151)	RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPPLMVYAQAANLHLLLLRDAS

Фиг. 6С

	201	250
IP1B-B100	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B101	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B102	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B64	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B62	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B63	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B61	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B82	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B83	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B60	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B81	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B65	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B66	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B67	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B68	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B69	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
IP1B-B80	(201) LFGSEFGLTSQEIORYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW	
	251	300
IP1B-B100	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B101	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B102	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B64	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B62	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B63	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B61	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B82	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B83	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B60	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B81	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B65	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B66	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B67	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B68	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B69	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	
IP1B-B80	(251) LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN	

Фиг. 6D

	301	350
IP1B-B100	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B101	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B102	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B64	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B62	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B63	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B61	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B82	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B83	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B60	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B81	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B65	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B66	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B67	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B68	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B69	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS
IP1B-B80	(301)	APSGFASTNWFNNNAPSFS

	351	400
IP1B-B100	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B101	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B102	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B64	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B62	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B63	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B61	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B82	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B83	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B60	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B81	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B65	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B66	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B67	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B68	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B69	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE
IP1B-B80	(351)	QHMNYWVGHRLEFRPIGGTLNTSTHGATNTSINPVTLOFTSRDVYRTE

Фиг. 6Е

	401	450
IP1B-B100	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B101	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B102	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B64	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B62	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B63	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B61	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B82	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B83	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B60	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B81	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B65	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B66	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B67	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B68	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B69	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET
IP1B-B80	(401)	AGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQQLFDSET

	451	500
IP1B-B100	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B101	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B102	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B64	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B62	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B63	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B61	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B82	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B83	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B60	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B81	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B65	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B66	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B67	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B68	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B69	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT
IP1B-B80	(451)	ELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLIIGGTLRAPVYSWTHRSADRTNTIAT

Фиг. 6F

	501	550
IP1B-B100	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B101	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B102	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B64	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B62	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B63	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B61	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B82	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B83	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B60	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B81	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B65	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B66	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B67	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B68	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B69	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
IP1B-B80	(501) NIITQIPAVKGNFLFNGLVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYIEVP I	
	551	600
IP1B-B100	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B101	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B102	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B64	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B62	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B63	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B61	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B82	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B83	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B60	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B81	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B65	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B66	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B67	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B68	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B69	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	
IP1B-B80	(551) QFISTSTRYRVRVRYASVTPIRLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQSR	

Фиг. 6G

	601	650
IP1B-B100	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B101	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B102	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B64	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B62	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B63	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B61	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B82	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B83	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B60	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B81	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B65	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B66	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B67	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B68	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B69	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS
IP1B-B80	(601)	NFGYFESRNAFTSATGNVVGVRNFS

	651
IP1B-B100	(651) ERAQE
IP1B-B101	(651) ERAQE
IP1B-B102	(651) ERAQE
IP1B-B64	(651) ERAQE
IP1B-B62	(651) ERAQE
IP1B-B63	(651) ERAQE
IP1B-B61	(651) ERAQE
IP1B-B82	(651) ERAQE
IP1B-B83	(651) ERAQE
IP1B-B60	(651) ERAQE
IP1B-B81	(651) ERAQE
IP1B-B65	(651) ERAQE
IP1B-B66	(651) ERAQE
IP1B-B67	(651) ERAQE
IP1B-B68	(651) ERAQE
IP1B-B69	(651) ERAQE
IP1B-B80	(651) ERAQE

Фиг. 7А

1

50

Cry1Bd (1)

MTSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL

MO2-01 (1)

MTSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSLDARIEDSLCIAEGNNINPL

MP258 (1)

MTSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSEPDARIEDSLCIAEGNNINPL

MO2-02 (1)

MTSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMDLSEPDARIEDSLCIAEGNNINPL

51

100

Cry1Bd (51)

VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSSGRDPWEIF

MO2-01 (51)

VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSSGRDPWEIF

MP258 (51)

VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSSGRDPWEIF

MO2-02 (51)

VSASTVQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFIVGELWPSSGRDPWEIF

101

150

Cry1Bd (101)

LEHVEQLRQQVTENTERTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS

MO2-01 (101)

LEHVEQLRQQVTENTERTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS

MP258 (101)

LEHVEQLVRQQITENARTAIARLQGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDART

MO2-02 (101)

LEHVEQLVRQQITENARTAIARLQGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDART

151

200

Cry1Bd (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO2-01 (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MP258 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO2-02 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

201

250

Фиг. 7А (продолжение)

Cry1Bd (201)
 LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW
 MO2-01 (201)
 LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW
 MP258 (201)
 LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW
 MO2-02 (201)
 LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

251

300
 Cry1Bd (251)
 LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRITYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN
 MO2-01 (251)
 LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRITYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN
 MP258 (251)
 LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN
 MO2-02 (251)
 LRYNQFRRDLTLGVLDLVALFPSYDTRIYPINTSAQLTREIYTDPIGRTN

301

350
 Cry1Bd (301)
 APSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST
 MO2-01 (301)
 APSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDFPEQLTIFSVLSRWSNT
 MP258 (301)
 APSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAVIRPPHLLDFPEQLTIFSVLSRWSNT
 MO2-02 (301)
 APSGFASTNWFNNNAPSFSAIEAAIFRPPHLLDFPEQLTIYSASSRWSST

Фиг. 7В

351

400

Cry1Bd (351)

QHMYWVGHRLNFRPIGGTLNTSTQGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES

MO2-01 (351) QYMYWVGHRLNFRPIGGTLNTSTQGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES

TSINPVTLOFTSRDVYRTES

MP258 (351) QYMYWVGHRLNFRPIGGTLNTSTQGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES

TSINPVTLOFTSRDVYRTES

MO2-02 (351)

QHMYWVGHRLNFRPIGGTLNTSTQGLTNNTSINPVTLOFTSRDVYRTES

401

450

Cry1Bd (401)

NAGTNILETTTPVNGVPWARFNFINPQNIYERGATTYSQPYQGVGIQLEFDS

MO2-01 (400) YAGINILLETTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-

GSLLYTIGYTGVTQLEFDS

MP258 (400) YAGINILLETTTPVNGVPWARFNWRNPLNSLR-

GSLLYTIGYTGVTQLEFDS

MO2-02 (401)

NAGTNILETTTPVNGVPWARFNFINPQNIYERGATTYSQPYQGVGIQLEFDS

451

500

Cry1Bd (451)

ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI

MO2-01 (449)

ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLISGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI

MP258 (449)

ETELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLISGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI

MO2-02 (451)

ETELPPETTERPNYESYSHRLSHIGLIIGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTI

501

550

Cry1Bd (501)

GPNRITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYLEV

MO2-01 (499)

ATNIITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYLEV

MP258 (499)

ATNIITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYLEV

MO2-02 (501)

ATNIITQIPAVKGNFLFNGSVISGPGFTGGDLVRLNNSGNNIQNRGYLEV

551

600

Cry1Bd (551)

PIQFTSTSTRYRVRYASVTSIELNVNLGNSSIFTNTLPATAASLDNLO

Фиг. 7В (продолжение)

MO2-01 (549)
 PIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQ
 MP258 (549)
 PIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQ
 MO2-02 (551)
 PIQFISTSTRYRVRVRYASVTPIQLSVNWGNSNIFSSIVPATATSLDNLQ

601

650
 Cry1Bd (601)
 SGDFGYVEINNAFTSATGNIVGARNFSANAEVIIDRFEFIPVTATFEAEY
 MO2-01 (599)
 SRDFGYFESTNAFTSATGNVVGVRNFSENAGVIIDRFEFIPVTATFEAEY
 MP258 (599)
 SRDFGYFESTNAFTSATGNVVGVRNFSENAGVIIDRFEFIPVTATFEAEY
 MO2-02 (601)
 SRDFGYFESTNAFTSATGNVVGVRNFSENAGVIIDRFEFIPVTATFEAEY

651

Cry1Bd (651) DLERAQK
 MO2-01 (649) DLERAQE
 MP258 (649) DLERAQE
 MO2-02 (651) DLERAQE

Фиг. 8

101

150

Cry1Bd (101)

LEHVEQLIRQQVTENTRNTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS

MO5-02 (101)

LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDARS

MO5-03 (101)

LEHVEQLIRQQVTENTRNTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDART

MO5-05 (101)

LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDART

MO5-04 (101)

LEHVEQLIRQQVTENTRNTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS

MO5-07 (101)

LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDARS

MO5-01 (101)

LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAVQQSLEDWLENRDDART

MO5-06 (101)

LEHVEQLIRQQVTENTRNTAIARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDART

151

200

Cry1Bd (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-02 (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-03 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-05 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-04 (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-07 (151)

RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-01 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

MO5-06 (151)

RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

201

250

Cry1Bd (201)

LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-02 (201)

LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW

Фиг. 8 (продолжение)

MO5-03 (201)

LFGSEWGMASSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-05 (201)

LFGSEWGMASSDVNQYYQEQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-04 (201)

LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-07 (201)

LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-01 (201)

LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

MO5-06 (201)

LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

Фиг. 9

101

150

MP258 (101)
 LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAYQQSLEDWLENRDDART
 MO4-02 (101)
 LEHVEQLVRQQVTENTRNTAARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRDDART
 MO4-03 (101)
 LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAYQQSLEDWLENRNDARS
 MO4-05 (101)
 LEHVEQLVRQQVTENTRNTAARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS
 MO4-01 (101)
 LEHVEQLVRQQVTENTRNTAARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRNDARS
 MO4-06 (101)
 LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAYQQSLEDWLENRNDARS
 MO4-04 (101)
 LEHVEQLVRQQITENARNTALARLOGLGASFRAYQQSLEDWLENRDDART
 MO4-07 (101)
 LEHVEQLVRQQVTENTRNTAARLEGLGRGYRSYQQALETWLDNRDDART

151

200

MP258 (151)
 RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-02 (151)
 RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-03 (151)
 RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-05 (151)
 RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-01 (151)
 RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-06 (151)
 RSIILERYVALELDITTAIPLFRIRNEEVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-04 (151)
 RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS
 MO4-07 (151)
 RSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAINNQQVPLLMVYAQAANLHLLLLRDAS

201

250

MP258 (201)
 LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW
 MO4-02 (201)
 LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW

Фиг. 9 (продолжение)

MO4-03 (201)
LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW
MO4-05 (201)
LFGSEFGLTSQEIQRYYERQAEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESW
MO4-01 (201)
LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW
MO4-06 (201)
LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW
MO4-04 (201)
LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW
MO4-07 (201)
LFGSEWGMASSDVNQYYQEIQIRYTEEYSNHCVQWYNTGLNNLRGTNAESW